

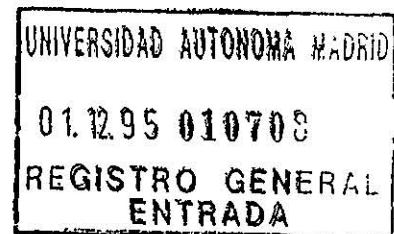
DBC 67.268

SC / C / 1168

**UNIVERSIDAD AUTONOMA DE MADRID**  
**FACULTAD DE CIENCIAS**  
Departamento de Biología Molecular



**SEÑALIZACION INTRACELULAR**  
**MEDIADA POR LOS RECEPTORES DE**  
**PROLACTINA**



**TESIS DOCTORAL**

**JUAN JOSE BERLANGA CHIQUEIRO**  
Madrid, 1995

**Este trabajo ha sido realizado en  
el Centro de Biología Molecular "Severo Ochoa" (CSIC-UAM)  
bajo la dirección de la Prof. D<sup>a</sup> J. Predestinación García Ruiz**

*A Juana, mi esposa*

## **AGRADECIMIENTOS**

En primer lugar, agradezco a Predes la oportunidad que me ha brindado para poder realizar el trabajo de esta tesis en su laboratorio y bajo su dirección, así como su apoyo y su amistad durante todos estos años en los que tantos buenos momentos hemos compartido trabajando codo con codo.

También agradezco el interés y amistad mostrado por todas las personas que a lo largo de estos años han pasado por los laboratorios C-X-470 y C-X-320, especialmente a Marta, Pepa, José Antonio, Juan Carlos, Emilia, Milagros, Ascen y a los recién llegados, Isabel, Samuel, Yolanda, Encarna y Sonia.

Agradezco al profesor Paul A. Kelly la oportunidad que me brindó de trabajar en su laboratorio y a todo el personal de la Unidad 344 del INSERM su apoyo durante mi estancia allí, especialmente a Marc Edery, Martine Applanat, Oreste y Fran.

Agradezco a todas las personas que trabajan en el Centro su ayuda en todo momento, destacando a mis compañeros de comida Víctor, Cristina, Esther, Raquel, etc, etc, con los que he compartido muchos y muy buenos momentos, y con los que me he desahogado en los momentos difíciles.

Por supuesto, agradezco muy especialmente a Juana, mi esposa su apoyo incondicional en todo momento, sin el que este trabajo no habría salido adelante.



## **ABREVIATURAS**

## ABREVIATURAS

<b>aa</b>	Aminoácido
<b>ATP</b>	Adenosina trifosfato
<b>cDNA</b>	Acido desoxirribonucleico complementario
<b>CHX</b>	Cicloheximida
<b>CTP</b>	Citosina trifosfato
<b>DNA</b>	Acido desoxirribonucleico
<b>EDTA</b>	Acido etilendiaminotetraacético
<b>EGF</b>	Factor de crecimiento epidérmico
<b>GDP</b>	Guanosina difosfato
<b>GTP</b>	Guanosina trifosfato
<b>IL</b>	Interleuquina
<b>IRS</b>	Sustrato del receptor de insulina
<b>Kb</b>	Kilobase
<b>KDa</b>	Kilodalton
<b>MAb</b>	Anticuerpo monoclonal
<b>mRNA</b>	Acido ribonucleico mensajero
<b>PDGF</b>	Factor de crecimiento derivado de plaquetas
<b>PI3K</b>	Fosfatidilinositol 3-quinasa
<b>PIP</b>	Fosfatidilinositol fosfato
<b>PKC</b>	Proteína quinasa C
<b>PMSF</b>	Fluoruro de fenilmetilsulfonilo
<b>SDS</b>	Dodecil sulfato sódico
<b>SH2</b>	Dominio de homología Src tipo 2
<b>SH3</b>	Dominio de homología Src tipo 3
<b>TK</b>	Tirosina quinasa

## **INDICE**

## **INDICE**

<b>I. INTRODUCCION.</b>	<b>1</b>
<b>1. Prolactina.</b>	<b>1</b>
<b>2. Acciones biológicas de PRL.</b>	<b>1</b>
<b>3. Distribución y regulación de la expresión de los receptores de PRL.</b>	<b>3</b>
<b>4. Estructura del receptor de PRL. Identificación de múltiples formas. Familia de receptores de GH/PRL/Citoquinas.</b>	<b>4</b>
<b>5. Señalización intracelular de receptores de citoquinas.</b>	<b>6</b>
<b>5.1. Asociación con tirosina quinasas citosólicas.</b>	<b>6</b>
<b>5.2. Activación de otras proteínas señalizadoras.</b>	<b>7</b>
<b>5.2.1. Activación de PI3K.</b>	<b>8</b>
<b>5.2.2. Señalización a través de IRS1.</b>	<b>8</b>
<b>5.2.3. Activación de la vía de señalización de Ras.</b>	<b>9</b>
<b>5.2.4. Activación de los factores de transcripción Stat.</b>	<b>10</b>
<b>5.2.5. Regulación de la expresión de protooncogenes nucleares.</b>	<b>11</b>
<b>6. Señalización intracelular del receptor de PRL.</b>	<b>11</b>
<b>6.1. Asociación con tirosina quinasas citosólicas.</b>	<b>12</b>
<b>6.2. Activación de la vía de señalización de Ras.</b>	<b>12</b>
<b>6.3. Activación de los factores de transcripción Stat.</b>	<b>13</b>

6.4. Secuencias de PRLR implicadas en señalización.	14
<b>II. OBJETIVOS.</b>	16
<b>III. MATERIALES Y METODOS.</b>	17
1. Aislamiento de hepatocitos de rata y cultivo de líneas celulares	17
1.1. Aislamiento de hepatocitos de rata.	17
1.2. Cultivo de la línea celular de glándula mamaria.	17
1.3. Cultivo de la línea celular 293.	17
2. Ensayos de transfección transitoria e inducción del promotor de b-caseína.	18
3. Inmunoprecipitación y anticuerpos.	18
3.1. Ensayos con hepatocitos aislados de rata.	18
3.2. Ensayos con la línea celular 293.	19
4. Ensayo de quinasa <i>in vitro</i> .	20
5. Ensayo de Western-blot.	20
6. Aislamiento y cuantificación de mRNA (Ensayo de Northern-blot).	21
7. Purificación del receptor de prolactina modificado (FPRLR) y proteínas asociadas mediante cromatografía de afinidad.	22
8. Actividad fosfatidilinositol 3-quinasa <i>in vitro</i> .	22

<b>IV. RESULTADOS.</b>	<b>23</b>
<b>1. Señalización intracelular de PRL en hígado de rata.</b>	<b>23</b>
1.1. Asociación de una actividad tirosina quinasa al receptor de PRL.	23
1.2. Asociación de la tirosina quinasa pp60 <sup>c-src</sup> al receptor de PRL en hepatocitos aislados.	24
1.3. Efecto de PRL sobre la fosforilación en tirosina de pp60 <sup>c-src</sup> en hepatocitos aislados.	25
1.4. Efecto de PRL sobre la actividad tirosina quinasa de pp60 <sup>c-src</sup> en hepatocitos aislados.	26
1.5. Efecto de PRL sobre los niveles estacionarios de mRNA de los protooncogenes c-fos, c-jun y c-src en hepatocitos aislados.	27
<b>2. Funcionalidad de las isoformas larga y corta del receptor de PRL en células de glándula mamaria.</b>	<b>28</b>
2. 1. Efecto de PRL sobre la actividad del promotor de $\beta$ -caseína en células de glándula mamaria transfectadas con las distintas formas del receptor de PRL.	28
2.2. Efecto de la coexpresión de las isoformas del receptor de PRL sobre la actividad del promotor de $\beta$ -caseína inducida por PRL.	29
<b>3. Señalización mediada por el receptor de PRL posterior a la activación de tirosina quinasas en células 293.</b>	<b>30</b>
<b>V. DISCUSION.</b>	<b>32</b>
<b>VI. CONCLUSIONES.</b>	<b>38</b>
<b>VII. BIBLIOGRAFIA.</b>	<b>39</b>
<b>VIII. ANEXO.</b>	<b>54</b>

# **INTRODUCCION**

## **1. Prolactina.**

La hormona prolactina (PRL) fue originalmente identificada por Stricker y Grueter en 1928 como un factor de la pituitaria capaz de inducir la secreción de leche en conejos. Posteriormente se demostró la presencia de PRL no sólo en mamíferos, sino también en todos los vertebrados. Cuando PRL fue purificada, el análisis de su secuencia reveló la existencia de regiones de gran homología con la hormona de crecimiento (GH), el lactógeno placentario y la somatotropina coriónica. Estas cuatro proteínas forman una familia de hormonas polipeptídicas que parecen provenir de la duplicación de un único gen ancestral (Niall y col., 1971).

## **2. Acciones biológicas de PRL.**

En vertebrados, PRL ha sido implicada en gran variedad de funciones (Nicoll y col., 1972), éstas pueden subdividirse en siete grandes categorías: i) reproducción y lactancia; ii) balance hídrico y salino; iii) crecimiento y morfogénesis; iv) metabolismo; v) comportamiento; vi) regulación del sistema inmune; y vii) efectos sobre el ectodermo y la piel. La importancia de estas funciones varía según las especies. En mamíferos, la principal acción atribuida a PRL es el desarrollo de la glándula mamaria y la lactogénesis, por ello el tejido más estudiado ha sido la glándula mamaria, donde PRL actúa junto con insulina y glucocorticoides estimulando la síntesis de las proteínas de la leche, tanto aumentando la transcripción de sus genes, como estabilizando sus mRNAs (Guyette y col., 1979).

PRL también regula otras funciones reproductivas, modulando los efectos de las gonadotropinas (Armstrong y col., 1970; Kelly y col., 1980): i) aumento del número de receptores de hormona luteinizante en testículo durante la pubertad; ii) estimulación de la esteroidogénesis en el cuerpo lúteo; iii) incremento de la unión de lipoproteínas de alta y de baja densidad en el cuerpo lúteo; y iv) estimulación del crecimiento de los folículos ováricos.

En humanos, además de ejercer las funciones ya mencionadas, PRL regula la expresión de un gen que codifica por una proteína, llamada proteína regulada por PRL (PIP), estabilizando su mRNA (Murphy y col., 1987b). PIP se ha encontrado en algunas líneas celulares de cáncer de mama y en tumores de mama tanto benignos como malignos (Murphy y col., 1987a). También se encuentra en algunas glándulas exocrinas como salivares, lacrimales y sudoríparas (Haagensen y Mazovjian, 1986) y sus secreciones (Murphy y col., 1987a), pero se desconoce su función.



El papel biológico del alto número de receptores de PRL en el hígado, particularmente en ratas hembra, no se conoce muy bien. La administración de PRL en ratas provoca hipertrofia hepática e incrementa la actividad ornitina descarboxilasa en hígado (Buckley y col., 1985; Richards, 1975). También se ha demostrado que PRL estimula la expresión del mRNA de la forma citosólica de la fosfoenolpiruvato carboxiquinasa y del protooncogen c-myc en hígado y en cultivos primarios de hepatocitos de rata lactante (Zabala y García-Ruiz, 1989). Todo ello podría significar que PRL regula crecimiento y/o diferenciación hepáticos. En hígado de rata PRL induce un factor, llamado sinlactina que actúa sinérgicamente con PRL para estimular el crecimiento de la glándula mamaria, (Nicoll y col., 1985).

Recientemente se ha demostrado que PRL y GH actúan como factores estimuladores sobre el sistema inmune. Se sabía que ratas hipofisectomizadas presentan glándulas tímicas atrofiadas y menor capacidad de respuesta inmunológica. Otros modelos que permiten asociar a PRL y GH este papel inmunorregulador, son los ratones Snell o Ames, que carecen tanto de GH como de PRL en su pituitaria, presentando el timo y otros tejidos linfoides atrofiados y una depleción de su médula ósea (Baroni, 1967). Estudios de suplementación de hormonas, en ambos modelos, han demostrado que tanto GH como PRL son capaces de devolver una función inmunológica normal (Nagy y col., 1983).

Los estudios de efectos directos de PRL sobre linfocitos aislados han obtenido distintos resultados, como son el incremento de la proliferación celular de linfocitos (Hartman y col., 1989; Murkherjee y col., 1990), y también de la actividad citotóxica de células 'natural killer' (NK) (Matera y col., 1990). Además es interesante la observación de la producción de PRL en linfocitos normales (Hartmann y col., 1989) y de una PRL mutada en una línea de células T (JURKAT) y en linfocitos de sangre periférica (Pellegrini y col., 1992). Todo esto sugiere además que PRL puede ser considerada como un factor de crecimiento, actuando de forma paracrina o incluso autocrina en el sistema inmune.

En células de ovario de hámster (CHO) que expresan de forma estable el receptor de PRL de glándula mamaria de conejo, PRL inhibe el crecimiento a la vez que induce la expresión de un gen marcador de diferenciación ovárica (P450scc), observándose que ambos efectos son inversamente proporcionales al grado de confluencia de las células (Bignon y col., 1995).

### **3. Distribución y regulación de la expresión de los receptores de PRL.**

Los receptores de prolactina están localizados en la membrana plasmática y son los encargados de transmitir el mensaje hormonal al interior de la célula. Los receptores de PRL están ampliamente distribuidos en mamíferos (Tabla I; Hughes y col., 1985), aunque la función de PRL en algunos de estos tejidos aún no se conoce. Los tejidos que presentan un mayor número de receptores de PRL son el hígado y la glándula mamaria. En estos tejidos un gran porcentaje de los receptores se encuentra en membranas intracelulares, tales como endosomas, Golgi y lisosomas (Bergeron y col., 1978, 1986). Esto posiblemente se deba a una rápida y constante síntesis y degradación de los receptores, incluso cuando estos no se encuentran ocupados por la hormona (Djiane y col., 1982). Los receptores de PRL también se han encontrado y caracterizado en citosol de hígado de ratas hembras y en glándula mamaria de conejo (Amit y col., 1984; Ymer y col., 1987), así como una forma soluble en la leche (Postel-Vinay y col., 1991).

En cuanto a la regulación hormonal de los receptores de PRL, es poco lo que se sabe, ya que aún se desconoce la estructura de su promotor. Los estudios realizados hasta ahora se basan en la administración de hormonas a animales, por lo que los efectos observados pueden ser directos o indirectos. La identificación y análisis de la secuencia del promotor, así como estudios de regulación en células en cultivo pueden arrojar luz sobre este tema. Por lo que sabemos hasta la fecha, esta regulación es distinta según el órgano del que se trate. En la glándula mamaria el número de receptores aumenta considerablemente muy temprano en la lactancia, mientras que durante la gestación la cantidad de receptores es baja, probablemente debido a los altos niveles de progesterona circulantes en ese período (Djiane y col., 1977). En hígado de rata el número de receptores es mayor en hembras que en machos y se regula por estrógenos (Posner y col., 1974). Sin embargo, en la próstata la testosterona incrementa el número de receptores, mientras que los estrógenos tienen un efecto contrario (Kledzik y col., 1976). En el hígado probablemente los esteroides actúen de forma indirecta, incrementando la secreción de PRL, ya que ésta es capaz de aumentar o disminuir el número de receptores, en función de la concentración y del tiempo de exposición a la hormona. En este sentido, la regulación negativa precede a la regulación positiva y es rápidamente reversible en presencia de altas concentraciones de PRL, debido a la rápida internalización de los complejos hormona-receptor y su degradación en lisosomas (Djiane y col., 1980). La regulación positiva ocurre tras varios días de tratamiento con niveles moderados de hormona (Posner y col., 1975) y es bloqueada por progesterona en glándula mamaria (Djiane y col., 1977). También GH estimula la expresión de los receptores de PRL en

---

<b>Glándula mamaria:</b>	<b>Pancreas:</b>
Normal	Islotes de Langerhans
Tumores	
Leche	<b>Intestino</b>
<b>Ovario:</b>	<b>Riñón</b>
Células de la granulosa	<b>Corteza suprarrenal</b>
<b>Cuerpo lúteo</b>	<b>Sistema inmune:</b>
<b>Utero</b>	Timo
<b>Placenta</b>	Timocitos
<b>Testículo:</b>	Linfocitos
Células de Leydig	Eritrocitos
Espermátida	Neutrófilos
<b>Epidídimo</b>	<b>Cerebro:</b>
<b>Vesícula seminal</b>	Hipotálamo
<b>Próstata:</b>	Sustancia negra
Normal	Plexo coroideo
Tumoral	<b>Ojo:</b>
<b>Hígado</b>	Córnea
	Fotoreceptores

---

**Tabla I. Distribución de los receptores de PRL en órganos y tejidos de mamíferos. (Kelly y col., 1993)**

hígado de rata, como ocurre en ratones transgénicos que sobreexpresan GH ovina (Baxter y col., 1984; Orian y col., 1991).

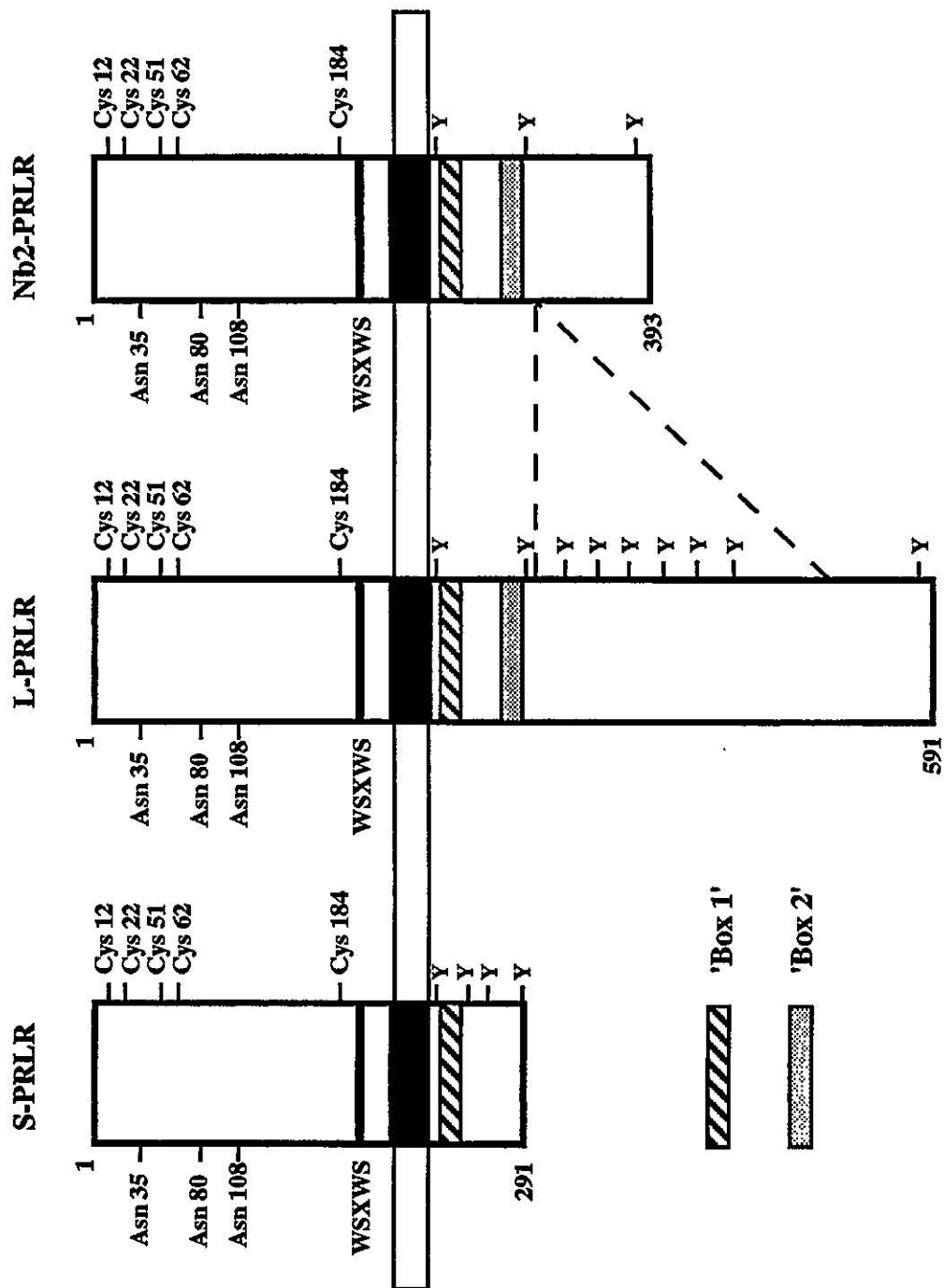
La expresión del receptor de PRL parece estar regulada tanto en su transcripción como a nivel postranscripcional (Jolicoeur y col., 1989). Esta regulación no sólo afecta al número de receptores, sino que en algunos tejidos, aunque el número total de receptores no se modifica, hay un cambio en la proporción relativa de las isoformas larga y corta que se expresa. En este sentido, en todos los órganos donde se expresa el receptor de PRL la isoforma mayoritaria es la larga, siendo el hígado el único tejido en el que la isoforma corta es predominante (Nagano y Kelly, 1994).

#### **4. Estructura del receptor de PRL. Identificación de múltiples formas. familia de receptores de GH/PRL/Citoquinas.**

La secuencia del receptor de PRL deducida de un cDNA de una genoteca de hígado de rata presenta 291 aa, con un dominio extracelular de 210 aa, un dominio transmembrana de 24 aa y un dominio citoplásmico de sólo 57 aa (Boutin y col., 1988). Más tarde, y usando este cDNA como sonda, se identificó una segunda forma de receptor en hígado y ovario con 591 aa idéntica a la forma corta hasta el residuo 262 (Shirota y col., 1990). Ambas isoformas sólo difieren en su dominio intracelular, ya que se generan por un procesamiento alternativo a partir de un único gen que en rata consta de once exones que se extienden a lo largo de más de 70 kb (Kelly y col., 1993). El exón once codifica por la región citoplasmática de la forma corta del receptor, mientras que el exón diez codifica por la región citoplasmática de la forma larga. Posteriormente se ha hallado una tercera forma de receptor de PRL en una línea celular de linfoma T de rata (Nb2) que es totalmente dependiente de PRL para su crecimiento (Gout y col., 1980; Shiu y col., 1983). Esta forma de receptor tiene un tamaño intermedio entre la forma larga y la corta (393 aa) debido a la delección de 198 aa del dominio citoplásmico de la forma larga del receptor de PRL (Ali y col., 1991).

Los receptores de PRL de humanos, conejo y ratón han sido clonados y secuenciados, presentando características estructurales idénticas a las observadas en rata y gran homología de secuencia (revisado por Kelly y col., 1993).

Las características estructurales más destacadas de su dominio extracelular son la presencia de cinco cisteínas, cuatro de las cuales se encuentran formando puentes disulfuro dos a dos, la presencia de una secuencia triptófano-serina-aa no conservado-triptófano-serina (WSXWS) y la existencia de tres residuos de asparagina glicosilables (Asn-35, Asn-80, Asn-108). El dominio de unión de ligando está formado por siete cadenas en



**Figura 1. Representación esquemática de las isoformas de PRLR de rata.** Las características estructurales más destacadas aparecen indicadas: Asn=asparagina; Cys=cisteína; WSXWS=triptófano-serina-aa no relevante-triptófano-serina; Y=tirosina. S-PRLR corresponde a la isoforma corta, L-PRLR a la isoforma larga y Nb2-PRLR corresponde a la isoforma intermedia expresada en células Nb2.

conformación  $\beta$  antiparalelas y su estructura se mantiene gracias a dos puentes disulfuro entre residuos de cisteína.

En el dominio intracelular destaca una secuencia, próxima a la región transmembrana, rica en restos de prolina ('box 1'), que parece esencial para la señalización intracelular. Una segunda secuencia, próxima a la anterior, que no está presente en la forma corta, es homóloga a secuencias encontradas en otros receptores de citoquinas ('box 2').

La presencia de todas esas características estructurales repetidas en otros receptores ha hecho que la familia que originalmente incluía los receptores de GH y PRL (Boutin y col., 1989) en los últimos años haya crecido al incluirse en esta familia los receptores de un gran número de citoquinas (Bazan, 1989), como el factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF) (Fukunaga y col., 1990), eritropoyetina (EPO) (D'Andrea y col., 1989), factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF) (Gearing y col., 1989), así como la p75 o cadena  $\beta$  del receptor de interleuquina (IL) 2 (Hatakeyama y col., 1989), IL-3 (Itoh y col., 1990), IL-4 (Mosley y col., 1989), IL-5 (Takaki y col., 1990), IL-6 (Yamasaki y col., 1988), IL-7 (Goodwin y col., 1990) factor inhibidor de leucemia (LIF), oncostatina M (OSM) (Rose y Bruce, 1991), factor neurotrófico ciliar (CNF) (Bazan, 1991; Hall y Rao, 1992) e interferón (IFN)  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$  (Bazan, 1990a; Thoreau y col., 1991). Además la glicoproteína de 130 KD (gp130) que se asocia al receptor de IL-6 en la transducción de señal (Taga y col., 1990), es miembro de esta familia de receptores (Hibi y col., 1990). En humanos, GM-CSF, IL-3 e IL-5 tienen una subunidad  $\beta$  común de 120 KD que al igual que la cadena  $\alpha$  es miembro de esta familia (Gearing y col., 1989; Kitamura y col., 1991; Tavernier y col., 1991).

Todos estos receptores se caracterizan por poseer un solo dominio transmembrana y carecer de actividad enzimática intrínseca en su dominio intracelular. Aunque la identidad en cuanto a secuencia de aminoácidos es bastante baja (14-25%) y el tamaño del dominio extracelular es bastante diferente se repiten dos estructuras características de todos los miembros de esta familia de receptores. Una es la existencia de cuatro cisteínas en la zona amino-terminal de esta región, que se encuentran unidas secuencialmente dos a dos por puentes disulfuro (Fuh y col., 1990) y que parecen estar implicadas en conferir al receptor una estructura característica para la unión específica de ligando. En la zona carboxilo-terminal de esta región se encuentra una secuencia triptófano, serina, aa no conservado, triptófano, serina (WSXWS) en todos los miembros de la familia salvo en el receptor de GH. Esta secuencia podría estar implicada en unión de los receptores a sus ligandos o en interacción del complejo hormona-receptor con moléculas accesorias o en dimerización de receptores (revisado por Kelly y col., 1993). Esta familia presenta mayor homología cuando se compara la estructura secundaria de su dominio extracelular con

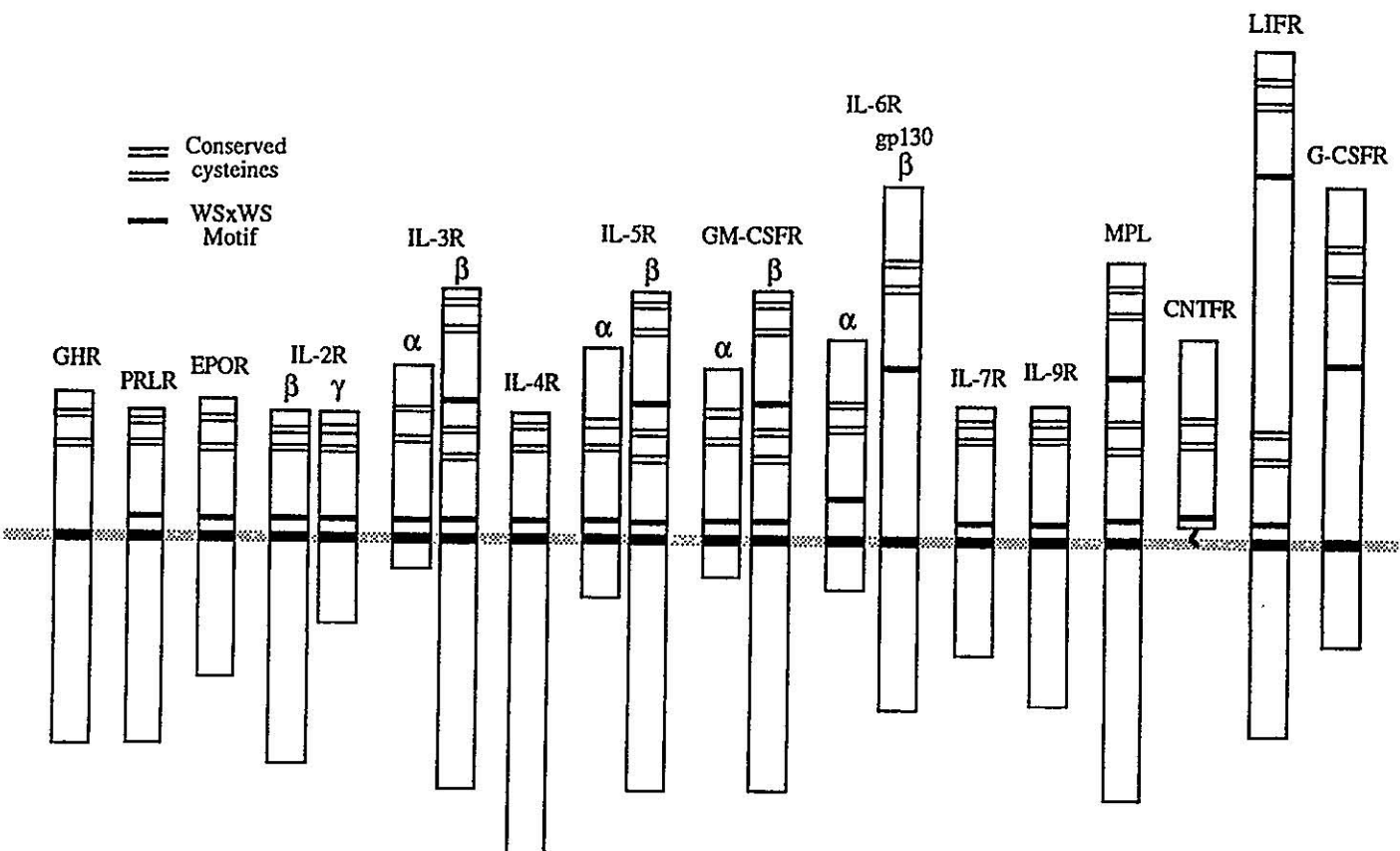


Figura 2. Representación esquemática de los receptores pertenecientes a la familia de receptores de GH/PRL/citoquinas. Los restos de cisteína y el motivo triptófano-serina-aa no relevante-triptófano-serina (WSXWS) aparecen indicados.



siete cadenas  $\beta$  en zonas conservadas que parecen contribuir a la unión de ligando (Bazan, 1990b).

A pesar de las diferencias de tamaño y secuencia de los dominios intracelulares de los distintos receptores pertenecientes a esta familia, la mayoría de ellos poseen en la región cercana al dominio transmembrana dos motivos conservados ('box 1' y 'box 2') directamente implicados en los efectos celulares mediados por estos receptores (Sakamaki y col., 1992; Goujon y col., 1994).

## **5. Señalización intracelular de receptores de citoquinas.**

Ninguno de los receptores de la familia de receptores de citoquinas posee actividad enzimática intrínseca que pueda ser responsable de transmitir la señal intracelular inducida por la unión de ligando. Los distintos receptores han resuelto este problema mediante la asociación de proteínas citosólicas con actividad enzimática capaces de iniciar la señal intracelular mediada por estos receptores. Así, la acción de estas citoquinas se inicia estimulando la asociación de estas proteínas señalizadoras a su receptor y modulando su actividad o, simplemente, modulando la actividad de proteínas constitutivamente unidas al receptor.

### **5.1. Asociación con tirosina quinasas citosólicas.**

Los receptores de citoquinas carecen de actividad TK propia, sin embargo, la estimulación de estos receptores produce una rápida fosforilación en tirosina de proteínas intracelulares y de los propios receptores, así como de proteínas con actividad TK, pues éstos son capaces de asociar y/o activar proteínas citosólicas con actividad TK, a través de las cuales inician rutas de señalización. Diferentes familias de tirosina quinasas se han implicado en la transmisión de señales por estos receptores (revisado por Taniguchi, 1995): familia Src, familia JAK, familia Syk/ZAP-70, familia Itk/ Btk/Tec y familia Fes/Fps/Fer.

Estructuralmente, las quinasas de la familia Src constan de: un grupo acilo en el extremo amino-terminal, para su localización cercana a la membrana plasmática; un dominio SH3 de interacción con proteínas portadoras de secuencias ricas en prolina; un dominio SH2 de interacción con proteínas fosforiladas en tirosina; un dominio con actividad tirosina quinasa; y un dominio portador de secuencias reguladoras en el extremo carboxilo-terminal (revisado por Bolen y col., 1991). La primera de estas quinasas implicada en señalización por receptores de esta familia fue p56<sup>lck</sup> (Lck), que se encontró



<b>Receptores citoquinas</b>	<b>Tirosina quinasas</b>		
	<b>Familia Src</b>	<b>Familia JAK</b>	<b>Otras</b>
IL-2R	Lck, Fyn, Lyn	JAK1, JAK3	Syk, ZAP-70
IL-3R	Lyn	JAK1, JAK2	Fes, Tec
IL-4R		JAK1, JAK3	
IL-5R	Fyn	JAK1, JAK2	Btk
IL-6R		JAK1, JAK2, TYK2	Hck, Btk, Tec
IL-7R	Fyn	JAK1, JAK3	
IL-12R		JAK2, TYK2	
GM-CSFR		JAK1, JAK2	Fes
G-CSFR	Lyn	JAK1, JAK2	Syk
GHR		JAK2	
PRLR	Fyn	JAK1, JAK2	
EPOR		JAK2	Fes
IFN $\alpha/\beta/\gamma$ R		JAK1, JAK2, TYK2	

**Tabla II. Tirosina quinasas activadas por receptores de citoquinas.**  
(Taniguchi, 1995).

físicamente asociada al receptor de IL-2 en ausencia de estímulo y se activaba tras la unión de ligando. Posteriormente, se ha encontrado que otras tirosina quinasas de esta familia, como son Fyn y Lyn, están relacionadas física y funcionalmente con el receptor de IL-2 y con otros receptores de citoquinas (revisado por Taniguchi, 1995) (Tabla)

En la familia JAK de tirosina quinasas se incluyen cuatro miembros, JAK-1, JAK-2, TYK-2 y JAK-3. La característica más llamativa de esta familia es la presencia en su región carboxilo-terminal de dos dominios con secuencias consenso de tirosina quinasas. Sin embargo, sólo uno de ellos está completo. Carecen de dominios SH2 o SH3, presentes en gran número de proteínas de señalización, pero presentan cinco dominios de homología entre los distintos miembros de la familia, que podrían intervenir en la interacción con receptores de citoquinas. Su relación con los receptores de citoquinas se descubrió por su implicación en señalización por los distintos tipos de interferón, descubriéndose que JAK-1, JAK-2 y TYK-2 eran esenciales en la respuesta celular a interferones. Después se ha comprobado su participación en transmisión de señales de otros receptores de la misma familia (Tabla) (revisado por Taniguchi, 1995), con los que interaccionan a través de los motivos 'box 1' y 'box 2' (Ihle y col., 1994).

Los miembros de la familia Syk/ZAP-70 presentan dos dominios SH2, además del dominio TK. Tanto Syk como ZAP-70 se han encontrado asociadas al receptor de IL-2 (IL-2R) y se activan por IL-2. En cuanto a las otras familias de TK, se han visto implicadas en la señalización de algunas citoquinas como IL-5, IL-6, GM-CSF, EPO, pero no se conoce mucho acerca su activación y modo de acción (Taniguchi, 1995).

La mayoría de los receptores de citoquinas asocian y activan distintas tirosina quinasas pertenecientes a la misma o a distintas familias. El ejemplo más evidente es el de IL-2R, donde se han encontrado asociadas TK de las familias Src (Lck, Fyn, Lyn), JAK (JAK1, JAK3) y Syk/ZAP-70 (revisado por Minami y Taniguchi, 1995) Esto podría implicar bien la formación de complejos multiproteicos de señalización, o bien, la existencia de vías señalizadoras diferentes en distintos tipos celulares, dependiendo del repertorio de TK y otras proteínas transductoras expresado.

## **5.2. Activación de otras proteínas señalizadoras.**

Además de la asociación y activación de TK, y en muchos casos como consecuencia de ello, los receptores de citoquinas asocian y activan otras proteínas implicadas en cascadas amplificadoras de la señal. Las más destacadas por ser las más generales son fosfatidilinositol 3-quinasa (PI3K), sustrato del receptor de insulina (IRS1), proteínas de la ruta de activación de p21-Ras y los factores llamados transductores de señal y activadores de transcripción (Stat). En muchos casos el mismo

receptor es capaz de actuar a través de todas estas rutas, lo que parece indicar que se utilizan distintas vías de señalización dependiendo del tipo celular y del efecto final producido.

### **5.2.1. Activación de PI3K.**

La activación de PI3K juega un papel clave en la transducción de señales de numerosos factores de crecimiento y citoquinas. Como su nombre indica fosforila distintos fosfoinosítidos en la posición 3 del anillo de inositol. Aunque no se conoce muy bien la función de los productos de su actividad, los niveles celulares de éstos se encuentran elevados en células en mitosis o transformadas por oncogenes (Irvine, 1992). Sólo se ha visto que algunos de estos productos inducen *in vitro* la actividad de la isoforma  $\zeta$  de PKC (Nakanidhi y col., 1993), que parece jugar un papel crítico en la señalización mitogénica (Berra y col., 1993).

PI3K es un heterodímero compuesto por una subunidad reguladora de 85 KDa y una subunidad catalítica de 110 KDa. La subunidad reguladora (p85) presenta dos dominios SH2, un dominio SH3 y un dominio de unión a la subunidad catalítica, que consta de un dominio lípido-quinasa y un dominio de unión a p85. La actividad de este enzima parece regularse fundamentalmente por su asociación a través de los dominios SH2 de p85 a proteínas portadoras de tirosinas fosforiladas cerca de la membrana plasmática, donde se encuentran sus sustratos (revisado por Fry, 1994). Esas proteínas portadoras de fosfotirosinas pueden ser receptores activados, TK citosólicas u otras proteínas fosforiladas en respuesta a factores de crecimiento o citoquinas. En algunos casos la propia p85 es fosforilada en tirosina, aunque dicha fosforilación no parece relevante para la actividad del enzima. Aunque coinmunoprecipita con receptores activados por ligando, no siempre la asociación es directa como ocurre con el receptor de IL-2 o receptores de factores de crecimiento (Truitt y col., 1994; Coughlin y col., 1989; Kazlauskas y Cooper, 1989), sino que en muchos casos se hace a través de proteínas de anclaje ('docking proteins') sin actividad enzimática o de tirosina quinasas citosólicas, formando complejos multiproteicos de señalización.

### **6.2.2. Señalización a través de IRS1.**

A diferencia de otros receptores con actividad tirosina quinasa intrínseca (RTK) que asocian y activan directamente proteínas con dominios SH2, el receptor de insulina (IR) lo hace mediante la fosforilación en tirosina de IRS1 (Rothenberg y col., 1991). Esta

proteína citosólica de 185 KDa carece de actividad enzimática y posee al menos veinte tirosinas, además de treinta restos de serina/treonina, fosforilables (White, 1994). Su fosforilación en tirosina ocurre de manera rápida tras la estimulación por ligando y le permite asociar y activar distintas proteínas señalizadoras portadoras de dominios SH2, como PI3K, el complejo GRB2/SOS y otras que disparan distintas rutas de señalización. IRS1 se asocia de manera transitoria al receptor de insulina y es fosforilada en tirosina por éste, pero IRS1 puede ser fosforilada por TK citosólicas de la familia Src o de la familia JAK de forma dependiente de ligando (revisado por White, 1994).

El descubrimiento de IRS1 ha sido fundamental para entender la activación de PI3K por algunos receptores de citoquinas. Recientemente se ha demostrado que algunas citoquinas como IL-4 (Wang y col., 1993), GH, LIF, IFN- $\gamma$  (Argetsinger y col., 1995) e IFN- $\alpha$  (Uddin y col., 1995) inducen la fosforilación en tirosina de IRS1 y su asociación con PI3K vía dominios SH2 de p85. En el caso de IL-4, se ha encontrado una proteína llamada 4PS ó IRS2 (Wang y col., 1992) que actúa del mismo modo que IRS1.

### **5.2.3. Activación de la vía de señalización de Ras.**

Ras es una proteína de pequeño tamaño anclada a membrana plasmática que une e hidroliza nucleótidos de guanina. Cuando Ras une GTP pasa a una conformación activa que le permite interaccionar con otras proteínas y modular su actividad. La hidrólisis de GTP hace que Ras quede unido a GDP y, por tanto, en una conformación no activa. Existen dos tipos de proteínas que modulan su actividad, unas que inducen su actividad GTPasa, conocidas como GAP, y otras que favorecen el intercambio de GDP por GTP, conocidas como GEF. La interacción de Ras con GEF hace que pase a una forma activa, mientras que la interacción con GAP hace que adquiera una forma inactiva (revisado por McCormick, 1994).

Las citoquinas modulan la actividad de Ras a través de dos proteínas que actúan como GEF, que son SOS y VAV. SOS es una proteína citosólica de alto peso molecular que se asocia a la proteína adaptadora GRB2. GRB2 es una proteína de 25 KDa consistente en dos dominios SH3 y un dominio SH2. A través de los dominios SH3 interacciona con SOS y a través del dominio SH2 se une a proteínas fosforiladas en tirosina como IRS1, RTK, TK citosólicas, bien directamente o mediante la proteína SHC que posee un dominio SH2 y se fosforila en tirosina (revisado por McCormick, 1994). Recientemente se ha demostrado que GH activa Ras vía JAK2, que fosforila SHC de manera que pueda interaccionar con el complejo GRB2-SOS que se trasloca a la membrana para interaccionar con Ras y activarla (VanderKuur y col., 1995). Esta vía de

señalización también es activada por otros receptores de citoquinas (Miura y col., 1994; Welham y col., 1994).

VAV es una proteína de 95 KDa que de forma dependiente de ligando se une a complejos de receptores activados y es fosforilada en tirosina, lo cual hace que se localice cerca de la membrana plasmática y pueda interaccionar con Ras y activarla (Gulbins y col., 1993).

Una vez Ras está en una forma activa se une a la serina/treonina quinasa Raf-1 (Moodie y col., 1993) activando su autofosforilación y la fosforilación de su sustrato MAP-quinasa quinasa (MEK), que se activa y fosforila a MAP-quinasa (MAPK). La fosforilación en tirosina de MAPK hace que ésta se active y se trasloque al núcleo, donde modula la actividad de determinados factores de transcripción mediante fosforilación en restos de serina/treonina (revisado por Kazlauskas, 1994).

#### **5.2.4. Activación de los factores de transcripción Stat.**

La activación de tirosina quinasas citosólicas determina la fosforilación de la propia quinasa, del receptor al que se asocia y de otras proteínas citosólicas. Algunas de las proteínas sustrato de la actividad de JAK quinasas pertenecen a la familia de factores de transcripción conocidos como Stat, cuya localización celular y actividad se regula por fosforilación en tirosina. Estas proteínas contienen dominios SH2 y se asocian al complejo quinasa-receptor de forma dependiente de ligando para ser fosforilados en tirosina. Una vez fosforilados y mediante interacciones fosfotirosina-SH2 forman dímeros o complejos multiméricos que se traslocan al núcleo para estimular la transcripción uniéndose a secuencias específicas en los promotores de los genes que regulan (Shuai y col., 1993, 1994; Pawson, 1995). La activación de Stats es un fenómeno general entre los receptores de citoquinas. IFN- $\gamma$  induce fosforilación de p91-Stat1 que forma un complejo activo con p113-Stat2. IFN  $\alpha$  y  $\beta$  inducen la formación del trímero Stat1-p84-Stat2 al que se une una proteína de 48 KDa y así inducen la expresión génica (Fu, 1992). IL-6 actúa activando APRF (factor de activación de proteínas de fase aguda), también llamado Stat3 (Akira y col., 1994; Zhong y col., 1994), e IL-4 activa Stat6. El factor Stat5 es activado por GH, EPO y GM-CSF (Gouilleux y col., 1995). Hay un Stat4 que es activado por IL-12 (Taniguchi, 1995).

Un caso curioso es el de Stat5 que a pesar de ser fosforilado *in vitro* por tirosina quinasas de la familia Src, sólo su fosforilación por JAK2 induce su unión a DNA (Gouilleux y col., 1995).

### **5.2.5. Regulación de la expresión de protooncogenes nucleares.**

Protooncogenes nucleares, incluyendo c-fos, c-jun y c-myc, son dianas de señales proliferativas mediadas por factores de crecimiento y citoquinas (Ryseck y col., 1988; Müller y col., 1984). Estas proteínas nucleares son factores de transcripción que así regulan respuestas celulares inmediatas y proliferación (Curran y Franza, 1988). Un ejemplo bien caracterizado en la regulación de estos protooncogenes es el de IL-2, que podría ser extensivo a otras citoquinas cuyos receptores pertenecen a la misma familia y activan las mismas vías de señalización. Parece claro que la activación de c-fos y c-jun por IL-2 se realiza mediante la activación de p56<sup>lck</sup>, a través de la ruta mediada por Ras y MAPK. La inducción de c-myc parece seguir otra vía en la que está implicada la TK Syk, aunque no se descarta la participación de JAK1/JAK3 a través de la activación de Stats (ver revisión de Minami y Taniguchi, 1995). También se ha descubierto una secuencia llamada SIE, cercana al elemento de respuesta a suero (SRE) del gen de c-fos, a la que se une el factor de transcripción p91-Stat1 activado (Fu y Zhang, 1993), lo cual abre una nueva ruta de activación de c-fos mediada por JAKs.

Aunque las tirosina quinasas de la familia Src activan la vía Ras, se ha visto que pp60<sup>c-src</sup> activa la transcripción de c-myc de manera independiente de Ras (Erpel y Courtneidge, 1995). Por otra parte, se ha descubierto una proteína conocida como Sam68 que es sustrato de Src quinasas durante la mitosis y se asocia con los dominios SH2 y SH3 de Src. Sam68 es una proteína que se une a RNA heterogéneo nuclear (hnRNA) y cuya función podría ser la de estabilización, procesamiento y transporte de RNA (Fumagalli y col., 1994).

## **6. Señalización intracelular del receptor de PRL.**

En los fenómenos de señalización intracelular inducidos por PRL hay que tener en cuenta las diferentes isoformas de PRLR y su funcionalidad. En este sentido, las isoformas larga (L-PRLR) e intermedia (Nb2-PRLR) presentan características funcionales muy similares entre sí que las diferencian claramente de la isoforma corta (S-PRLR), debido a las secuencias de sus dominios intracelulares, si bien todas ellas poseen una secuencia rica en prolinas llamada 'box 1' que es muy importante en la transmisión de señales. Además de 'box 1' hay una segunda secuencia cercana ('box 2') importante en señalización que sólo está presente en las isoformas L y Nb2 de PRLR.

Recientemente se ha comprobado que PRL induce la transcripción del gen del factor 1 de respuesta a interferón IRF1 en células Nb2 (Yu-Lee y col., 1990). Otros genes inducidos por PRL son los de las proteínas de la leche,  $\beta$ -lactoglobulina y  $\beta$ -



caseína, así como el gen de  $\alpha_2$ -macroglobulina (Gaddykurten y Richards, 1991; Gu y col., 1992). Ensayos funcionales han revelado que tanto L-PRLR como la Nb2-PRLR median la inducción por PRL de los promotores de estos genes, mientras que S-PRLR es totalmente inactiva en estos estudios (Lesueur y col., 1991). En otro tipo de estudios, se ha observado que la expresión estable de L-PRLR y Nb2-PRLR en células dependientes de IL-3 (BAF-3 Y FDC-P1) hace a estas células dependientes de PRL, hecho que no ocurre cuando se intenta expresar S-PRLR (O'Neal y Yu-Lee, 1994).

### **6.1. Asociación de PRLR con tirosina quinasas citosólicas.**

En células Nb2, donde la isoforma de PRLR predominante es la intermedia (Nb2-PRLR), se ha demostrado la asociación de forma constitutiva o independiente de PRL de las TK JAK2 y p59<sup>fyn</sup>.

En el caso de JAK2, en respuesta a PRL se produce una rápida fosforilación en tirosina de la quinasa y a tiempos más largos del propio receptor, además de una inducción de la actividad quinasa *in vitro* de JAK2 (Rui y col., 1994a; Lebrun y col., 1994). Resultados similares se han obtenido en glándula mamaria de conejo y de ratón (Campbell y col., 1994; Waters y col., 1995). Estudios en células BAF-3 que expresan de forma estable L-PRLR han demostrado que PRL induce la fosforilación en tirosina tanto de las quinasas preasociadas JAK1 y JAK2 como del propio receptor (Dusanter-Fourt y col., 1994).

Siguiendo con las células Nb2, PRL estimula la actividad quinasa *in vitro* de p59<sup>fyn</sup>, medida tanto en autofosforilación como en fosforilación de enolasa como sustrato exógeno. En estas células, p59<sup>fyn</sup> está asociada a las tres isoformas de PRLR (Clevenger y Medaglia, 1994).

Por otra parte, tanto JAK2 como Fyn parecen activarse de manera dependiente de la dimerización del receptor, pues anticuerpos monovalentes (Fab) anti-PRLR no inducen activación de las TK, pero sí lo hacen anticuerpos bivalentes o monovalentes unidos mediante un segundo anticuerpo (anti-Fab) (Rui y col., 1994b; Clevenger y Medaglia, 1994).

### **6.2. Activación de la vía de señalización de Ras.**

La primera evidencia de la activación de esta vía de señalización por PRL, fue el hallazgo de la asociación constitutiva de la serina/treonina quinasa Raf-1 con las tres isoformas de PRLR en células Nb2. PRL induce la fosforilación en serina/treonina de la

propia quinasa *in vivo* y su actividad quinasa *in vitro* tanto en autofosforilación como en fosforilación de la histona H1 como sustrato exógeno (Clevenger y col., 1994).

Posteriores estudios en esta misma línea celular han revelado que PRL dispara dos tipos de señales que implican la activación de Ras y consecuentemente de Raf-1. En primer lugar, se observó que PRL induce asociación transitoria a su receptor, fosforilación en serina/treonina *in vivo* y actividad de liberación de GDP de Ras, del factor de intercambio de nucleótidos de guanina VAV (Clevenger y col., 1995).

Por otro lado, se ha demostrado que PRL estimula el intercambio de GDP por GTP de Ras mediado por la fosforilación en tirosina de SHC y su asociación a GRB2 y al factor de intercambio de nucleótidos de guanina SOS (Erwin y col., 1995).

Ambas vías tienen como resultado la activación de Ras que explicaría la implicación de Raf-1, cuya actividad inicia la cascada que a través de MAPK llevaría a la regulación de la expresión génica.

### **6.3. Activación de los factores de transcripción Stat.**

Se han identificado al menos dos factores Stat cuya fosforilación en tirosina y consecuente activación está modulada por PRL.

En células Nb2 se observó que PRL inducía la transcripción del gen del factor de respuesta a interferón IRF1 (O'Neal y Yu-Lee, 1994). En el promotor de este gen hay una secuencia necesaria para la activación de su expresión por IFN- $\gamma$ , a la que se une el factor de transcripción p91-Stat1 (también regulado por IFN y otras citoquinas) de forma dependiente de PRL. PRL induce la fosforilación en tirosina de p91-Stat1, condición imprescindible para su unión a DNA, probablemente mediante la fosforilación por JAK2, puesto que PRL activa esta TK que es totalmente necesaria para la inducción de la expresión génica por IFN- $\gamma$  (David y col., 1994).

En aves, PRL induce la fosforilación en tirosina de una proteína de 95 KDa, antigénicamente relacionada con p91-Stat1, que se une a secuencias SIE (elemento inducible por sis) en el promotor del gen de c-fos (Sidis y Horseman, 1994).

El factor de transcripción MGF-Stat5 fue identificado en glándula mamaria de animales lactantes, viéndose que su unión a DNA es absolutamente necesaria para la inducción del gen de  $\beta$ -caseína (Standke y col., 1994). Su coexpresión con PRLR en células no mamarias confiere a éstas respuesta a PRL en inducción del promotor de  $\beta$ -caseína (Gouilleux y col., 1994). Sus secuencias de unión a DNA se han encontrado en promotores de genes de proteínas de la leche, del gen IRF1 y del gen de  $\alpha_2$ -macroglobulina. Este último se induce por PRL en útero y ovario (Gaddykurten y Richards, 1991; Gu y col., 1992)



En células COS transfectadas con el cDNA de MGF-Stat5 y de L-PRLR, Stat5 se fosforila en tirosina en respuesta a PRL, hecho que no se produce cuando se coexpresa con S-PRLR. Esta fosforilación es imprescindible para la unión de Stat5 a DNA y la inducción del promotor de  $\beta$ -caseína (Gouilleux y col., 1995). MGF-Stat5 se fosforila *in vitro* por JAK2, Lck, Fyn y Lyn, pero solamente la fosforilación por JAK2 le confiere actividad de unión a DNA. Por otra parte, cuando MGF-Stat5 se coexpresa con los receptores de GH, EPO y GM-CSF, que también activan JAK2, estas citoquinas inducen fosforilación en tirosina de MGF-Stat5 y su unión a DNA, sin embargo, ninguna de ellas induce el promotor de  $\beta$ -caseína (Gouilleux y col., 1995).

#### **6.4. Secuencias de PRLR implicadas en señalización.**

Estudios de coexpresión de JAK2 y Stat1 con las distintas isoformas de PRLR y formas mutadas han permitido localizar las secuencias responsables de la asociación y activación de JAK2 y Stat1 por PRL, así como de la inducción del promotor  $\beta$ -caseína.

Las tres formas naturales de PRLR asocian y activan fosforilación en tirosina de JAK2, pero sólo las isoformas L y Nb2 son fosforiladas en tirosina. Estos estudios demuestran claramente el requerimiento de la secuencia rica en prolinas 'box 1' para la asociación y activación de JAK2, sin embargo, este hecho no es suficiente para mediar la inducción de la síntesis de proteínas de la leche, sino que se requieren secuencias, tanto en el extremo carboxilo-terminal como otras situadas entre 'box 1' y una segunda secuencia ('box 2') conservada en distintos miembros de la familia de receptores de citoquinas, que no aparecen en la isoforma S-PRLR (Lebrun y col., 1995a).

En cuanto a p91-Stat1, todas las formas naturales y mutadas que asocian y activan JAK2, asocian e inducen fosforilación en tirosina de p91-Stat1 (Lebrun y col., 1995a). Esto podría indicar que p91-Stat1 se une a PRLR a través de las mismas secuencias que JAK2, o bien, que la asociación y activación de p91-Stat1 son dependientes de JAK2. Esto también demuestra que la activación de p91-Stat1 no es suficiente para la inducción del promotor de  $\beta$ -caseína. Podría afirmarse que es necesaria la activación de Stat5 para inducir síntesis de proteínas de la leche y que en esa activación son necesarias secuencias situadas entre 'box 1' y 'box 2' y secuencias en el extremo carboxilo-terminal.

Otros estudios de mutagénesis han demostrado que de las tres tirosinas comunes a las isoformas L y Nb2 de PRLR, en la isoforma Nb2 solamente se fosforila la situada en el extremo carboxilo terminal. La sustitución de esa tirosina por fenilalanina evita la respuesta a PRL en inducción del promotor de  $\beta$ -caseína mediada por la isoforma Nb2 y atenúa significativamente la respuesta mediada por la isoforma L-PRL (Lebrun y col., 1995b).

Todos estos datos indican que la asociación y activación de JAK2 y Stat1 no es suficiente para la transmisión de señales por PRLR y que se necesitan otras moléculas señalizadoras para tal fin.

## **OBJETIVOS**

Estudios previos de nuestro laboratorio habían demostrado que PRL incrementa la expresión génica del protooncogen c-myc (Zabala y García-Ruiz, 1989) y la concentración de calcio libre citosólico (Villalba y col., 1992) en hepatocitos aislados de rata. Por ello nos propusimos profundizar en los mecanismos moleculares de la señalización intracelular de los receptores de PRL. Para ello, se fijaron los siguientes objetivos:

1. Estudio de la posible activación y/o asociación por receptores de prolactina de proteínas responsables de iniciar la señalización intracelular, como son tirosina quinasas, fosfatidilinositol 3-quinasa y otras, que han sido implicadas en la transmisión de señales de receptores de la misma familia.
2. Estudio de la regulación génica de protooncogenes nucleares inducida por prolactina como base de su efecto de proliferación/diferenciación en hígado.
3. Estudio de la funcionalidad de las isoformas corta y larga del receptor de prolactina de rata en la respuesta lactogénica inducida por PRL.

## **MATERIALES Y METODOS**

## **1. Aislamiento de hepatocitos de rata y cultivo de líneas celulares.**

### **1.1. Aislamiento de hepatocitos de rata.**

Los hepatocitos fueron aislados de ratas Wistar lactantes entre el segundo y el tercer día después del parto. Los hígados se sometieron a perfusión (Hems y col., 1966) durante 20 minutos con medio Krebs-Henseleit sin calcio, conteniendo una concentración de 40 mg/ml de colagenasa (Boehringer Mannheim) y suplementado con 5 mM glucosa, 2 mM glutamina, 100 U/ml penicilina y 1% albumina bovina (Salavert e Inedjian, 1982). Las células fueron lavadas e incubadas como describen previamente en Zabala y García-Ruiz, 1989. La viabilidad de las células se determinó por la prueba de exclusión del compuesto azul trypan, siendo aproximadamente del 90%. La hormona prolactina utilizada en estos experimentos procede del NIDDK (National Hormone and Pituitary Program, U.S.A.).

### **1.2. Cultivo de la línea celular de glándula mamaria.**

La línea de células epiteliales de glándula mamaria bovina (BMGE) (Schmid y col., 1983) se creció en medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) completo (2 mM glutamina, mezcla de antibióticos (10% streptomycin, 6% penicilina G)), suplementado con suero fetal de ternera (FCS) al 20%.

### **1.3. Cultivo de la línea celular 293.**

La línea celular 293 (Graham y col., 1977; Harrison y col., 1977) que sobreexpresa de forma estable el receptor de prolactina que contiene la diana FLAG (IBI-Kodak) en el extremo amino-terminal (293-FPRLR) fue cedida por el Dr. P.A. Kelly (INSERM, Unité de Endocrinologie Moléculaire, Paris). Esta línea celular se creció en medio DMEM nut F-12 (GIBCO) completo (2 mM glutamina, mezcla de antibióticos (10% streptomycin, 6% penicilina G)), suplementado con suero fetal de ternera (FCS) al 10% y geneticina 250 µg/ml (G-418, Boehringer Mannheim). La estimulación de estas células se realizó en el mismo medio sin suero fetal.

## **2. Ensayos de transfección transitoria e inducción del promotor de $\beta$ -caseína.**

Las células BMGE se crecieron hasta un grado de confluencia del 60-70%, aproximadamente  $3 \times 10^5$  células, y 14-16 horas antes de la transfección se pusieron en medio GC<sub>3</sub> (Gasser y col., 1985), consistente en una mezcla de DMEM y Ham's F-12 (1:1) suplementado con transferrina (10  $\mu$ g/ml), insulina (80 mU/ml), glutamina (2.5 mM) y aminoácidos no esenciales (Sigma). Las células se transfectaron por el método de precipitación con fosfato cálcico (Southern y Berg, 1982) con 3  $\mu$ g del vector de expresión de  $\beta$ -galactosidasa pCH110 (Pharmacia), 1.5  $\mu$ g de un plásmido que contenía el promotor del gen de  $\beta$ -caseína de rata unido a la región codificante del gen de luciferasa y entre 1 y 6  $\mu$ g, según el experimento, de los plásmidos pER<sub>1</sub>1 (pECE-PRL-R forma corta) y/o pER<sub>2</sub>3 (pECE-PRL-R forma larga), donde los cDNAs que codifican por las formas corta y larga del receptor de prolactina están bajo el control transcripcional del promotor temprano del virus SV40. Tras 4 horas de incubación, las células se someten a un tratamiento con glicerol al 14% y se dejan en medio GC<sub>3</sub>, suplementado con 2.5 nM dexametasona, en presencia o ausencia de oPRL a una concentración de 0.4  $\mu$ g/ml (18 nM) entre 24 y 60 horas (Lesueur y col., 1991). Después de lisar las células, se midió la actividad luciferasa en las muestras y los valores se normalizaron con la actividad  $\beta$ -galactosidasa (Herbomel y col., 1984).

## **3. Inmunoprecipitación y anticuerpos.**

### **3.1 Ensayos con hepatocitos aislados de rata.**

Los hepatocitos aislados fueron estimulados o no con oPRL a distintas concentraciones y distintos tiempos y lisados en tampón de lisis (25 mM Tris-HCl pH 7.4, 4 mM EDTA, 50 mM fluoruro sódico, 10 mM pirofosfato sódico, 2 mM ortovanadato sódico, 1 mM fluoruro fenilmetilsufónico (PMSF), 0.3 mg/ml bacitracina, 0.3 mg/ml inhibidor de tripsina, 1mg/ml benzamidina, 2% Triton X-100) durante 30 minutos a 4°C. Cuando se utilizaron hígados enteros, se lavaron una vez con PBS frío y homogenizaron a 4°C en el mismo tampón de lisis, pero sin Triton X-100 (1 gramo de tejido en 5 ml de tampón), con un homogenizador Polytron en tres pases de 30 segundos y se ajustó la concentración de Triton X-100 al 2% en el homogenizado. Después de 30 minutos a 4°C con agitación ocasional, el material insoluble se eliminó mediante centrifugación a 25000 x g durante 45 minutos a 4°C. Los sobrenadantes se diluyeron (1:1) con tampón A (20 mM Tris-HCl pH 7.4, 140 mM NaCl, 5 mM EDTA y 1% Triton

X-100) previamente a la inmunoprecipitación. Cuando los extractos fueron obtenidos de tejido, se clarificaron previamente a la inmunoprecipitación con Pansorbin (Calbiochem).

Los anticuerpos utilizados en estos ensayos fueron: dirigidos contra la fracción extracelular de PRLR, los anticuerpos monoclonales U5, U6 ó T6 (caracterizados por Okamura y col., 1989), a una concentración de 2 µg/ml; dirigidos contra la tirosina quinasa pp60<sup>c-src</sup>, los anticuerpos monoclonales 327 (cedido por J.S. Brugge) y LA074 (Quality Biotech Inc.) a una concentración de 5 µl de líquido ascítico/ml; y el anticuerpo monoclonal anti-fosfotirosina PY20 (ICN Biochemicals) a una concentración de 2 µg/ml. Las inmunoprecipitaciones se realizaron durante 2 horas a 4°C y los complejos inmunes fueron purificados utilizando inmunoglobulina de conejo anti-ratón (RAM) (Nordic Immunological Laboratories) unida a proteína A-sefarosa (Sigma) y lavados como sigue: tres veces con tampón B (10 mM Tris-HCl pH 7.4, 5 mM EDTA, 50 mM NaCl, 30 mM pirofosfato sódico, 50 mM fluoruro sódico, 100 µM ortovanadato sódico, 1% Triton X-100, 1 mM PMSF, 2 µg/ml leupeptina, 0.5 mg/ml benzamidina); una vez con 0.5 M LiCl, 100 mM Tris-HCl pH 7.4; y, finalmente, dos veces con 10 mM Tris-HCl pH 7.4, 1 mM EDTA, 100 mM NaCl. Dependiendo del experimento, las proteínas se separaron en geles de poliacrilamida-SDS y se transfirieron a membranas de nitrocelulosa, o bien, se sometieron a ensayo de quinasa.

### **3.2 Ensayos con la línea celular 293.**

Las células 293-FPRLR se crecieron hasta una confluencia del 80-90%, se hicieron quiescentes mediante incubación durante un mínimo de 6 horas en medio sin suero y se estimularon en ese mismo medio con oPRL a una concentración de 0.4 µg/ml. Tras la estimulación las células se lisaron durante 30 minutos a 4°C en un tampón de lisis cuya composición es la siguiente: 10 mM Tris-HCl pH 7.5, 5 mM EDTA, 150 mM NaCl, 30 mM pirofosfato sódico, 50 mM fluoruro sódico, 1 mM ortovanadato sódico, 10% glicerol, 0.5% Triton X-100, 1 mM PMSF, 2 µg/ml leupeptina, 5 µg/ml aprotinina, 4 µg/ml pepstatina A.

Los lisados se centrifugaron a 15000 x g 15 minutos a 4°C. Los sobrenadantes se utilizaron para analizar la presencia de FPRLR, PI3K, IRS-1 y proteínas fosforiladas en tirosina, incubándose con los correspondientes anticuerpos (anti-FLAG M2, Kodak; anti-fosfotirosina 4G10, anti-PI3K y anti-IRS-1, UBI) y proteína A sefarosa durante 14-16 horas a 4°C. A continuación se lavaron 3 veces con tampón de lisis y las proteínas contenidas en los inmunocomplejos se resolvieron en geles de poliacrilamida-SDS y se transfirieron a membranas de PVDF en tampón de transferencia (25 mM Tris, 192 mM glicina, 20% metanol) a 2 mA/cm<sup>2</sup> constantes durante 45 minutos.



#### **4. Ensayo de quinasa *in vitro*.**

El ensayo se llevó a cabo en los complejos inmunes inmovilizados con proteína A-sefariosa lavados como se detalla anteriormente y equilibrados con tampón de quinasa (30 mM Tris-HCl pH 7.4, 5mM MnCl<sub>2</sub>, 5 mM MgCl<sub>2</sub>). El ensayo se realizó en un volumen final de 20 µl de tampón de quinasa que contenía 10 µCi (γ-<sup>32</sup>P)ATP (3000 Ci/mmol) y 5 µg de enolasa desnaturalizada en medio ácido, durante 3 minutos a 25°C. Las reacciones fueron terminadas añadiendo 20 µl de tampón de muestra desnaturalizante 2 veces concentrado e hirviendo durante 10 minutos. Dependiendo del experimento se usó alternativamente un tampón de muestra no reductor cuya composición es la siguiente: 125 mM Tris-HCl pH 6.8, 4% SDS, 20% glicerol, 18.5 mg/ml iodoacetamida. Tras la resolución de las proteínas en geles de poliacrilamida-SDS, los geles se secaron o se transfirieron a nitrocelulosa y se expusieron a películas de autorradiografía (Kodak X-Omat AR). Las autorradiografías se analizaron mediante un scanner Molecular Dynamics o mediante Phosphorimager de Bio-Rad.

#### **5. Ensayo de Western-blot.**

Los ensayos de Western-blot se llevaron a cabo mediante los métodos habitualmente seguidos por los distintos laboratorios, introduciendo ligeras modificaciones en función del tipo de membrana y de los anticuerpos utilizados.

Para visualizar la presencia de pp60<sup>c-src</sup> en inmunocomplejos de receptor de prolactina, las membranas de nitrocelulosa se bloquearon a 37°C durante 2 horas y media con TBST (20 mM Tris-HCl pH 7.4, 137 mM NaCl, 0.05% Tween-20) conteniendo 5% proteínas de la leche (Fluka Biochemica), se incubaron 1 hora a 25°C con el anticuerpo anti-pp60<sup>c-src</sup> LA074 diluido 1:125 en TBST con 5% proteínas de la leche y, a continuación, se incubaron con un segundo anticuerpo marcado con <sup>125</sup>I (0.5 µCi/ml; Amersham). Después de los correspondiente lavados, las membranas se expusieron a una película de autorradiografía.

En otros casos las membranas de nitrocelulosa se bloquearon con 5% de albúmina bovina de suero (BSA) libre de ácidos grasos, o bien, con 5% de proteínas de la leche en TBST durante 3 horas y se incubaron toda la noche a 4°C con anticuerpo antifosforirosina PY20 (ICN Biochemicals) diluido 1:1000 en TBST con 1% BSA, o bien, con anticuerpo LA074 diluido 1:125 en TBST con 5% proteínas de la leche. El segundo anticuerpo utilizado estaba acoplado a peroxidasa y se reveló según el método de quimioluminiscencia de ECL (Amersham).

En los experimentos con la línea celular 293-FPRLR, después de la transferencia, las membranas de PVDF se bloquearon durante 2 horas a temperatura ambiente en 200 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl pH 7.6, 0.25% gelatina (Merck) y se incubaron toda la noche con el primer anticuerpo en tampón de bloqueo conteniendo 0.05% Tween-20. Después se lavaron 2 veces 10 minutos con 200 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl pH 7.6, 0.05% Tween-20 y se incubaron durante 1 hora con un segundo anticuerpo acoplado a peroxidasa diluido 1:4000 en el mismo tampón que el primer anticuerpo. Tras esto se hicieron 4 lavados de 30 minutos en el tampón de lavado anteriormente descrito y se revelaron según el método de quimioluminiscencia de ECL (Amersham).

Cuando las membranas se reutilizaron con distintos anticuerpos, después de cada uso se sometieron a un tratamiento que eliminó las inmunoglobulinas unidas. Este tratamiento se realizó siguiendo las recomendaciones de Amersham para este propósito y consistió en la incubación de las membranas a 50°C durante 30 minutos en un tampón que contenía 62.5 mM Tris-HCl pH 6.7, 100 mM 2-mercaptoetanol y 2% SDS, seguida por dos lavados con TBST previos al nuevo bloqueo de la membrana.

El análisis densitométrico de los resultados se realizó mediante un scanner Molecular Dynamics.

## **6. Aislamiento y cuantificación de mRNA (ensayo de Northern-blot).**

El RNA total se aisló de hepatocitos de rata usando el método de fenol y se enriqueció en RNA poliadenilado mediante el uso de una columna de oligo(deoxitimidina)-celulosa (Aviv y Leder, 1972). 5 µg de RNA poliadenilado fueron separados en geles desnaturalizantes de agarosa-formaldehído y transferidos a membranas de nylon (Zabala y García-Ruiz, 1989). Las sondas utilizadas fueron las siguientes: inserto Pst I de 2.6 kilobases de la secuencia de c-jun de ratón (Ryseck y col., 1988); inserto Pst I de 1.2 kilobases de la secuencia de c-fos de ratón, cedida por el Dr. Naranjo; y sondas específicas para c-src y β-actina (Clontech). Las sondas se marcaron por el método de 'nick translation' con (α-<sup>32</sup>P)deoxi-CTP con una actividad específica de 1-2 x 10<sup>8</sup> cpm/µg (Yoo-Warren y col., 1981). Los resultados de la hibridación con las distintas sondas se analizaron mediante un scanner Molecular Dynamics y se expresan en relación a los valores obtenidos para el mRNA de β-actina.

## **7. Purificación del receptor de prolactina modificado (FPRLR) y proteínas asociadas mediante cromatografía de afinidad.**

Células 293-FPRLR confluentes se incubaron 14-16 horas en medio sin suero y se estimularon o no con oPRL (400 ng/ml) durante distintos períodos de tiempo. Tras la estimulación las células se lavaron con PBS frío y se lisaron en un tampón que contenía 50 mM Tris-HCl pH 7.5, 100 mM NaCl, 0.8% Triton X-100, 8% (vol/vol) glicerol, 1 mM ortovanadato sódico, 1 mM PMSF, 2 µg/ml leupeptina, 5 µg/ml aprotinina, 4 µg/ml pepstatina A. Después de 30 minutos de lisis a 4°C, se centrifugaron durante 1 hora a 45000 rpm en un rotor 70 Ti a 4°C. Los sobrenadantes se diluyeron 1:5 con tampón B (50 mM Tris-HCl pH 7.5, 100 mM NaCl, 0.1% Triton X-100, 3% (vol/vol) glicerol, 0.1 mM PMSF, 1 mM CaCl<sub>2</sub>) y se pasaron a través de una columna de afinidad anti-FLAG M1 (IBI-Kodak) de 1 ml, la columna se lavó con 30 ml de buffer B y las proteínas retenidas se eluyeron con 6 ml de tampón B sin CaCl<sub>2</sub> y conteniendo 2 mM EDTA, puesto que la unión de las proteínas portadoras del epítopo FLAG a la columna es dependiente de calcio. Las muestras eluidas de la columna se concentraron hasta un volumen adecuado utilizando tubos Centriprep 30 y Microcon (Amicon). Las proteínas se separaron en geles de poliacrilamida-SDS y se transfirieron a membranas de PVDF para su análisis mediante Western-blot.

## **8. Actividad fosfatidilinositol 3-quinasa *in vitro*.**

Inmunocomplejos procedentes de células 293-FPRLR inmovilizados en proteína A-sefarosa se lavaron 3 veces con tampón de lisis, una vez con un tampón 0.5 M LiCl, 100 mM Tris-HCl pH 7.4 y una vez más con un tampón 10 mM Tris-HCl pH 7.4, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA. Los ensayos fueron realizados, según el método descrito por Auger y col., 1989, en 50 µl de una mezcla de reacción que contenía: 20 mM HEPES pH 7.4, 2 mM ortovanadato sódico, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 50 µM ATP, 5 µCi (γ-<sup>32</sup>P)ATP, 2 mg/ml fosfoinosítidos (Sigma). Previamente el sustrato fue solubilizado sonicándose en 5 mM HEPES pH 7.4. La reacción se inició mediante la adición de una mezcla MgCl<sub>2</sub>-ATP y se prolongó durante 20 minutos a 25°C, parándose con 100 µl de 1 M HCl. Los lípidos se extrajeron con 200 µl de cloroformo-metanol (1:1) y se separaron mediante cromatografía en capa fina TLC 60 (MERCK) utilizando como solvente 1-propanol-2 M ácido acético (65:35). La fosforilación de los lípidos se visualizó mediante autorradiografía y la actividad se cuantificó mediante densitometría.

## **RESULTADOS**

## **1. Señalización intracelular de PRL en hígado de rata.**

### **1.1. Asociación de una actividad tirosina quinasa al receptor de PRL.**

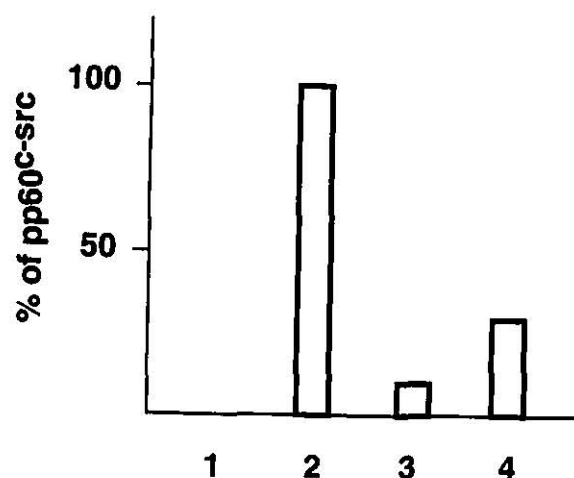
En primer lugar se analizó la posible asociación de alguna proteína con actividad proteína quinasa al receptor de prolactina que pudiera intervenir en la iniciación de la señalización intracelular de esta hormona, como ocurre con de otros receptores de la misma familia. Con este fin, se inmunoprecipitó PRLR de un lisado de hígado de rata lactante con el anticuerpo monoclonal T6/U5 y se sometió a un ensayo de quinasa *in vitro*, como se describe en *Materiales y Métodos*. En la Figura 3A se muestra un experimento representativo, donde se observó la presencia de tres proteínas fosforiladas, una correspondiente a la enolasa (47 kilodaltons, sustrato exógeno de tirosina quinasas), otra correspondiente a la cadena pesada de las inmunoglobulinas (55 kilodaltons) y otra de 60 kilodaltons, que coprecipitaron con el receptor de prolactina. La fosfoproteína de 60 KDa comigró con la tirosina quinasa pp60<sup>C-Src</sup> inmunoprecipitada del mismo lisado con el anticuerpo monoclonal 327. Como control negativo se utilizó un anticuerpo de conejo anti-ratón (RAM), en cuyo caso no aparece la fosfoproteína de 60 KDa. Con el propósito de conocer la naturaleza de la quinasa asociada al receptor de prolactina, el gel se trató con KOH, que elimina los grupos fosfato unidos a serina y treonina, pero no los grupos fosfato unidos a tirosina (Torigoe y col., 1992b). El fosfato radiactivo incorporado a las proteínas de 47 y 60 kilodaltons fue resistente al tratamiento con KOH (Figura 3B), lo que indica que dichas proteínas se fosforilaron en residuos de tirosina y, por tanto, había una actividad tirosina quinasa asociada al receptor de prolactina.

## **1.2. Asociación de la tirosina quinasa pp60<sup>c-src</sup> al receptor de PRL en hepatocitos aislados.**

Visto que una actividad tirosina quinasa coprecipitaba con el receptor de prolactina y que una proteína fosforilada en tirosina que coprecipitaba con el receptor de prolactina comigraba con la tirosina quinasa pp60<sup>c-src</sup>, se estudió la posible asociación de pp60<sup>c-src</sup> al receptor de prolactina. Para ello, alícuotas de  $6 \times 10^7$  células se incubaron 30 minutos en presencia o ausencia de oPRL 1 mg/ml. Los respectivos lisados se utilizaron para inmunoprecipitar PRLR con el MAb U5, o pp60<sup>c-src</sup> con el MAb LA074, y como control negativo se utilizó un suero preinmune de ratón. Las proteínas contenidas en los inmunocomplejos se separaron en un gel de poliacrilamida-SDS, se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa y se analizó la presencia de pp60<sup>c-src</sup> mediante Western-blot con el MAb LA074. Los resultados obtenidos muestran que la tirosina quinasa pp60<sup>c-src</sup> se asocia al receptor de prolactina cuando éste es activado por la hormona. La Figura 4 muestra un experimento representativo. En ausencia de prolactina pp60<sup>c-src</sup> apareció mínimamente asociada al receptor (parte superior, carril 3), mientras que tras la estimulación la cantidad de pp60<sup>c-src</sup> que coprecipitó con PRLR se incrementó significativamente (carril 4). El carril 2 muestra la cantidad total de pp60<sup>c-src</sup> inmunoprecipitada de la misma cantidad de células y el carril 1 muestra que dicha proteína no inmunoprecipitó utilizando suero preinmune de ratón. El análisis densitométrico (Figura 4, parte inferior) resume los resultados obtenidos en cuatro experimentos independientes. Como se puede apreciar la presencia de hormona prolactina estimuló significativamente la asociación de pp60<sup>c-src</sup> al receptor de prolactina en células hepáticas.

	1	2	3	4
pp60 <sup>c-src</sup>		●		●
oPRL	+	+	-	+
IP: prel	+	-	-	-
IP: U5	-	-	+	+
IP: LA074	-	+	-	-

BLOT: LA074



**Figura 4. Asociación de pp60<sup>c-src</sup> con PRLR.** Hepatocitos aislados de rata ( $6 \times 10^7$  células por condición) se incubaron 30 minutos en ausencia o presencia de oPRL (1  $\mu\text{g/ml}$ ). Los lisados se utilizaron para inmunoprecipitar PRLR con el anticuerpo U5 (carriles 3, 4) y pp60<sup>c-src</sup> con el anticuerpo LA074 (carril 2). Como control se utilizó un suero preinmune de ratón (carril 1). Las proteínas contenidas en los inmunocomplejos se solubilizaron con un tampón de muestra no reductor, se separaron en geles de poliacrilamida-SDS y se transfirieron a membranas de nitrocelulosa. La presencia de pp60<sup>c-src</sup> se detectó mediante Western-blot con el anticuerpo LA074, utilizando un segundo anticuerpo marcado con  $^{125}\text{I}$ , y autorradiografía. En la parte superior se muestra un experimento representativo, mientras que la parte inferior muestra el resumen del análisis densitométrico de cuatro experimentos independientes. Los resultados están expresados como porcentaje con respecto al valor obtenido en el carril 2.

### **1.3. Efecto de PRL sobre la fosforilación en tirosina de pp60<sup>c-src</sup> en hepatocitos aislados.**

Debido a que la actividad tirosina quinasa de pp60<sup>c-src</sup> es modulable, quisimos analizar si la hormona prolactina podía estar implicada en la estimulación de la actividad tirosina quinasa de esta proteína. Ha sido descrito que existe una correlación entre la autofosforilación de la tirosina quinasa y su actividad (Ralston y Bishop, 1985; Gould y Hunter, 1988; Kypta y col., 1988), por ello, estudiamos si el tratamiento con PRL cambiaba el estado de fosforilación en tirosina de pp60<sup>c-src</sup>. Así, hepatocitos aislados ( $6 \times 10^6$  células por punto) fueron estimulados durante 10 minutos con distintas concentraciones de PRL y la quinasa pp60<sup>c-src</sup> contenida en ellos fue inmunoprecipitada, utilizando el anticuerpo LA074. El contenido en fosfotirosina de pp60<sup>c-src</sup> fue determinado mediante Western-blot utilizando el anticuerpo anti-fosfotirosina PY20. Un experimento representativo de tres realizados se muestra en la Figura 5 (parte superior). Como se puede apreciar, en ausencia de hormona aparece cierta fosforilación residual (carril A), mientras que la fosforilación en tirosina de pp60<sup>c-src</sup> aumentó de una manera dependiente de la cantidad de hormona utilizada. En la parte inferior de la Figura 5 se muestra el resumen de los resultados obtenidos en tres experimentos independientes. La estimulación obtenida fue de 3.7 veces con respecto al control a una concentración de PRL de 1  $\mu\text{g/ml}$ , aunque el aumento ya era significativo (2 veces) a una concentración de 0.05  $\mu\text{g/ml}$ .



#### **1.4. Efecto de PRL sobre la actividad tirosina quinasa de pp60<sup>c-src</sup> en hepatocitos aislados.**

Una segunda aproximación más directa para determinar la posible estimulación de la actividad tirosina quinasa de pp60<sup>c-src</sup> fue la de medir dicha actividad *in vitro* utilizando enolasa desnaturalizada como sustrato exógeno. Para ello, hepatocitos aislados ( $6 \times 10^6$  células por punto) fueron incubados sin o con oPRL (1 µg/ml) y lisados a distintos tiempos entre 2 y 30 minutos. La quinasa pp60<sup>c-src</sup> fue inmunoprecipitada de los lisados y los inmunocomplejos fueron sometidos a un ensayo de reacción quinasa *in vitro* en presencia de enolasa desnaturalizada y ( $\gamma$ -<sup>32</sup>P)ATP durante 3 minutos (tiempo en el cual la velocidad de la reacción presenta una cinética lineal). Las proteínas se separaron en un gel de poliacrilamida-SDS y se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa. La membrana fue expuesta a autorradiografía para detectar el fosfato radiactivo incorporado a enolasa y, posteriormente, probada en Western-blot para cuantificar la cantidad de pp60<sup>c-src</sup> inmunoprecipitada. Los resultados de fosforilación fueron normalizados con la cantidad de pp60<sup>c-src</sup> y se expresan como veces de inducción con respecto a los datos obtenidos a tiempo cero (Figura 6A). Estos resultados, que resumen cuatro experimentos independientes, muestran que, como puede observarse, PRL estimuló la actividad de pp60<sup>c-src</sup> de manera transitoria con un máximo entre 2 y 10 minutos, regresando la actividad a los niveles basales a los 20 minutos. Como se muestra en la Figura 6B, PRL incrementó 1.8 veces la actividad quinasa de pp60<sup>c-src</sup>, medida como fosforilación de enolasa *in vitro*, tras 10 minutos de estimulación. Estos datos están de acuerdo con los obtenidos para la activación de pp60<sup>c-src</sup> por el factor estimulante de colonias 1 (CSF-1) (Courtneige y col., 1993) y sugieren que la transducción de señal de PRL en hepatocitos está mediada, al menos en parte, por la asociación de PRLR con pp60<sup>c-src</sup> y la estimulación de su actividad quinasa.

### **1.5. Efecto de PRL sobre los niveles estacionarios de mRNA de los protooncogenes c-fos, c-jun y c-src en hepatocitos aislados.**

Es bien conocido que los procesos de crecimiento y diferenciación promovidos por los distintos factores de crecimiento se inician mediante la inducción de la transcripción de los llamados genes de respuesta temprana (Ryseck y col., 1988; Müller y col., 1984; Curran y Franza, 1988). Resultados previos de nuestro laboratorio habían demostrado que PRL estimulaba la expresión del protooncogén de respuesta temprana c-myc (Zabala y García-Ruiz, 1989), por lo cual se analizó el posible papel de PRL en la expresión de otros genes de respuesta temprana como c-fos y c-jun, y de c-src. Por este motivo, hepatocitos aislados ( $5 \times 10^7$  células por punto) se preincubaron 30 minutos a  $37^\circ\text{C}$  con suave agitación y gaseo (95%  $\text{O}_2$  y 5%  $\text{CO}_2$ ) y se trataron o no con oPRL (1  $\mu\text{g/ml}$ ) en presencia o ausencia del inhibidor de síntesis de proteínas cicloheximida (CHX) durante 2 horas, en las mismas condiciones. Como se muestra en la Figura 7, la hormona prolactina incrementó significativamente los niveles estacionarios de mRNA de los protooncogenes c-fos, c-jun y c-src, tanto en presencia como en ausencia de cicloheximida. Estos resultados sugieren que la hormona prolactina tiene un papel estimulador del crecimiento hepático.

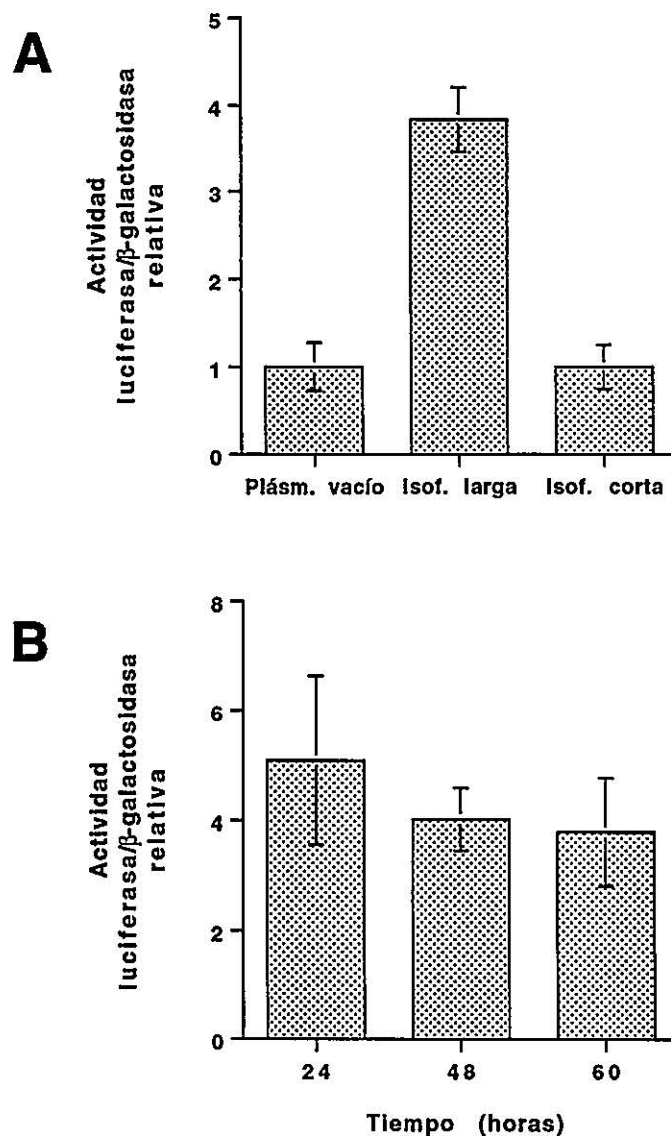
## **2. Funcionalidad de las isoformas larga y corta del receptor de PRL en células de glándula mamaria.**

Es bien sabido que, al menos en rata y ratón, los distintos tejidos expresan dos isoformas del receptor de prolactina en cantidades variables dependiendo del estado hormonal. Esto ocurre del mismo modo en la glándula mamaria donde la proporción de las dos isoformas cambia según el estado de gestación o lactancia del animal (Nagano y Kelly, 1994). Con objeto de estudiar la funcionalidad de ambas isoformas en la inducción de las proteínas de la leche se efectuaron estudios de expresión/coexpresión de las isoformas de PRLR de rata en células epiteliales de glándula mamaria bovina (línea celular BMGE) y se analizó la actividad del promotor de  $\beta$ -caseína en respuesta a prolactina.

### **2.1. Efecto de PRL sobre la actividad del promotor de $\beta$ -caseína en células de glándula mamaria transfectadas con las distintas isoformas del receptor de PRL.**

En primer lugar se comprobó que en estas células la prolactina no tenía efecto sobre la inducción del promotor de  $\beta$ -caseína, a menos que fueran transfectadas con cDNA codificante por una isoforma activa del receptor de PRL (isoforma larga). Como se muestra en la Figura 8A, en las células transfectadas con el plásmido de expresión vacío o conteniendo el cDNA de la isoforma corta del receptor, PRL no estimuló el promotor de  $\beta$ -caseína.

A continuación se estudió el tiempo de estimulación idóneo para la obtención de la máxima respuesta. Para ello, se transfectaron células con el cDNA de la isoforma larga del receptor de prolactina y se midió la activación del promotor de  $\beta$ -caseína estimulando las células entre 24 y 60 horas, observándose que la máxima estimulación ocurrió a las 24 horas (Figura 8B), mientras que a tiempos más largos la respuesta cayó ligeramente. En los ensayos que se realizaron a continuación las células se estimularon durante 24 horas.

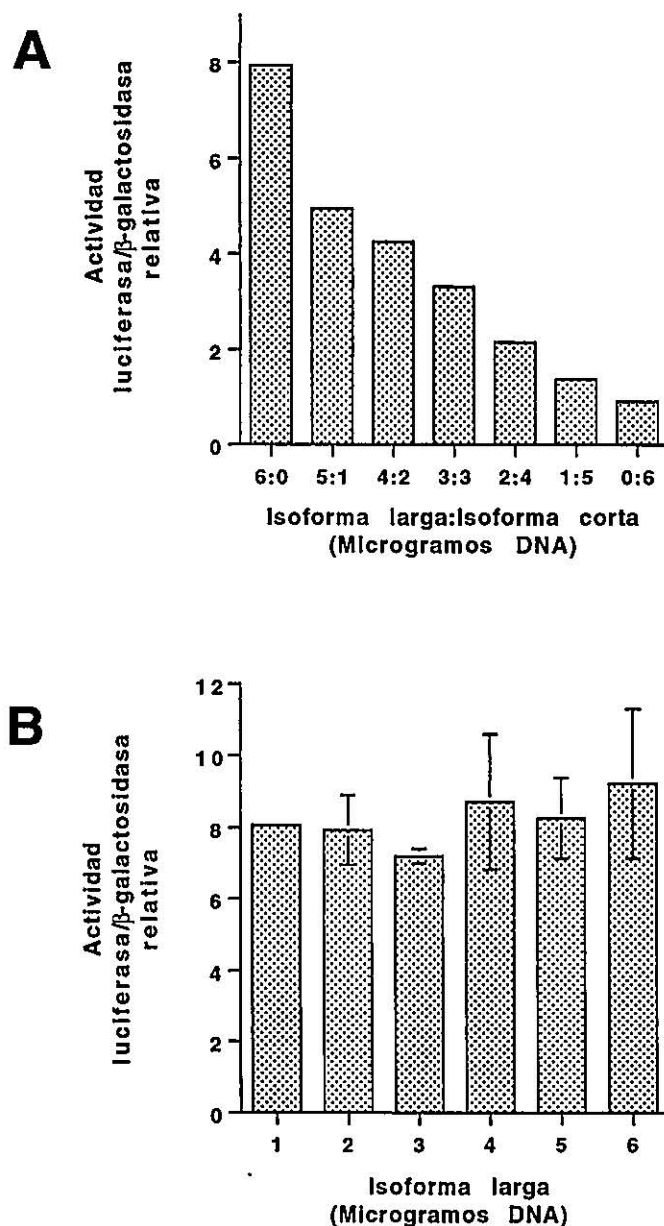


**Figura 8. Inducción por PRL del promotor de  $\beta$ -caseína en células BMGE.** Células BMGE ( $3 \times 10^5$  células por condición) fueron cotransfectadas transitoriamente con el plásmido de expresión de  $\beta$ -galactosidasa, el plásmido que contiene el promotor de  $\beta$ -caseína unido a luciferasa y plásmidos de expresión de las distintas isoformas de PRLR. Tras la estimulación con oPRL (400 ng/ml) las células se lisaron y se midió la actividad luciferasa, cuyos valores se normalizaron con los de la actividad  $\beta$ -galactosidasa. Los resultados se expresan como actividad luciferasa relativa tomando como unidad el valor obtenido en células no estimuladas. **(A)** Las células se cotransfectaron con el plásmido de expresión vacío o portando las secuencias de las isoformas corta o larga de PRLR, según se indica, y se estimularon durante 24 horas. **(B)** Las células se cotransfectaron con el plásmido de expresión de la isoforma larga de PRLR, se estimularon y se lisaron a los tiempos que se indican. La figura resume los resultados de cuatro experimentos independientes.



## **2.2. Efecto de la coexpresión de las isoformas del receptor de PRL de rata sobre la actividad del promotor de $\beta$ -caseína inducida por PRL.**

A pesar de que la isoforma corta no era activa en la inducción del promotor de  $\beta$ -caseína por PRL, decidimos estudiar el efecto de la coexpresión de ambas isoformas por si dicha coexpresión pudiera tener un efecto cooperativo para obtener una respuesta mayor e intentar entender el papel fisiológico de esta coexpresión en los distintos tejidos de rata. Con este fin las células se cotransfectaron con diferentes cantidades de los cDNAs codificantes por ambas isoformas del receptor para conseguir su coexpresión en distintas proporciones y analizar en las distintas situaciones el efecto de PRL sobre la inducción del promotor de  $\beta$ -caseína. El resultado que aparece en la figura 9A muestra que, a medida que disminuye la proporción de la isoforma larga y aumenta la de la isoforma corta del receptor, ocurre una significativa reducción en la capacidad de la prolactina para inducir el promotor. Para demostrar que este efecto no se debía a una menor expresión de la isoforma larga, se repitió el experimento sustituyendo el plásmido que codificaba por la isoforma corta por las mismas cantidades de un plásmido no codificante (Figura 9B), comprobándose que incluso con la cantidad más baja de isoforma larga PRL produjo una inducción del promotor del mismo rango que la producida con la máxima cantidad. Por todo ello, puede afirmarse que el efecto de PRL debido a la isoforma larga fue independiente de la cantidad de DNA utilizada y, por tanto, de la cantidad de receptor expresada, por lo que se deduce que la isoforma corta por sí sola es incapaz de inducir el promotor de  $\beta$ -caseína, pero cuando se coexpresa con la isoforma larga ejerce un papel inhibitorio o atenuador de la respuesta a PRL en la inducción de este promotor.



**Figura 9. Efecto de la coexpresión de las isoformas corta y larga de PRLR sobre la inducción del promotor de  $\beta$ -caseína por PRL.** Células BMGE ( $3 \times 10^5$  células por condición) fueron cotransfectadas transitoriamente con el plásmido de expresión de  $\beta$ -galactosidasa, el plásmido que contiene el promotor de  $\beta$ -caseína unido a luciferasa y plásmidos de expresión de las distintas isoformas de PRLR. Tras 24 horas de estimulación con oPRL (400 ng/ml) las células se lisaron y se midió la actividad luciferasa, cuyos valores se normalizaron con los de la actividad  $\beta$ -galactosidasa. Los resultados se expresan como actividad luciferasa relativa tomando como unidad el valor obtenido en células no estimuladas. (A) Las células se cotransfectaron con distintas cantidades de los plásmidos de expresión de las isoformas corta y larga de PRLR, según se indica. (B) Las células se cotransfectaron con distintas cantidades del plásmido de expresión de la isoforma larga de PRLR, según se indica.

### **3. Señalización mediada por el receptor de PRL posterior a la activación de tirosina quinasas en células 293.**

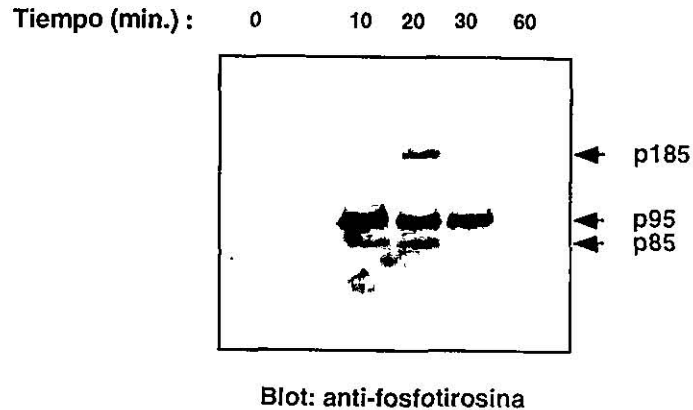
Estudios recientes en células 293 han demostrado la asociación de la tirosina quinasa JAK-2 al receptor de prolactina, así como su activación y fosforilación en tirosina en respuesta a prolactina (Lebrun y col., 1995a, 1995b).

Con el fin de estudiar la posible implicación de otras proteínas en la señalización intracelular mediada por el receptor de prolactina, se utilizó un clon procedente de la línea celular 293 que sobreexpresa la isoforma larga del receptor de prolactina modificada con el epítipo FLAG. En primer lugar, se llevó a cabo un abordaje similar al utilizado previamente para el receptor de insulina (Zhang y col., 1993), consistente en la purificación mediante cromatografía de inmutafinidad del receptor de prolactina modificado (FPRLR) y proteínas asociadas, de lisados de células tratadas o no con PRL ( $2 \times 10^7$  células por condición). El análisis mediante Western-blot anti-fosftirosina de las proteínas purificadas, reveló la aparición de dos proteínas de 85 y 185 KDa, además del receptor de prolactina (95 KDa), fosforiladas en tirosina. El experimento presentado en la Figura 10A, que muestra un ejemplo de los experimentos realizados, se llevó a cabo lisando las células tras distintos períodos de estimulación con PRL, observándose que a tiempo cero el receptor de prolactina presentaba bajos niveles de fosforilación en tirosina que aumentaron significativamente a los 10 minutos y se mantuvieron hasta los 30 minutos, para desaparecer a los 60 minutos. La ausencia de fosforilación en tirosina del receptor a los 60 minutos pareció deberse al procesamiento del mismo, como puede verse en el ejemplo mostrado en la Figura 10B, que corresponde a un Western-blot anti-FLAG, que revela la presencia del receptor modificado degradado. En cuanto a las proteínas de 85 y 185 KDa, aparecieron fosforiladas en tirosina a los 20 minutos ambas y desde los 10 minutos la de 85 KDa, de forma transitoria, puesto que a partir de los 30 minutos no se observó señal.

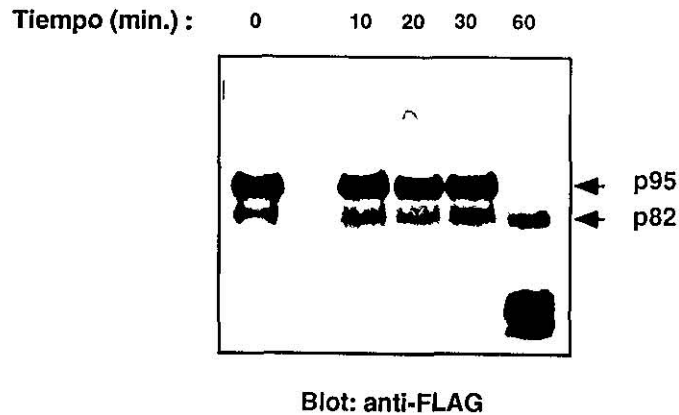
Los pesos moleculares de las proteínas fosforiladas en tirosina asociadas al receptor de prolactina eran coincidentes con los de la subunidad reguladora de la fosfatidilinositol-3 quinasa (p85) y con la proteína IRS1 (p185). Estas proteínas señalizadoras es conocido que participan en la señalización por insulina y, recientemente, se ha comprobado que GH, LIF, IFN- $\gamma$  e IFN- $\alpha$  estimulan la fosforilación en tirosina de IRS1 y su asociación con PI3K (Ridderstrale y col., 1995; Argetsinger y col., 1995; Uddin y col., 1995). Esta última se ha implicado en la señalización mediada por distintos receptores de citoquinas (revisado por Fry, 1994). Para comprobar si eran éstas las proteínas asociadas al receptor, se llevó a cabo inmunoprecipitación del receptor de prolactina modificado procedente de células estimuladas o no con PRL y mediante Western-blot se comprobó la coimmunoprecipitación de IRS1 (Figura 11A) y PI3K



**A**



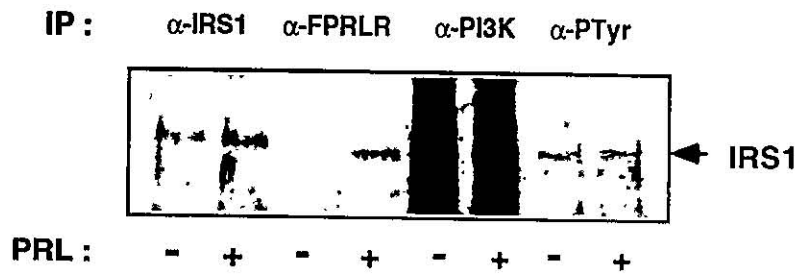
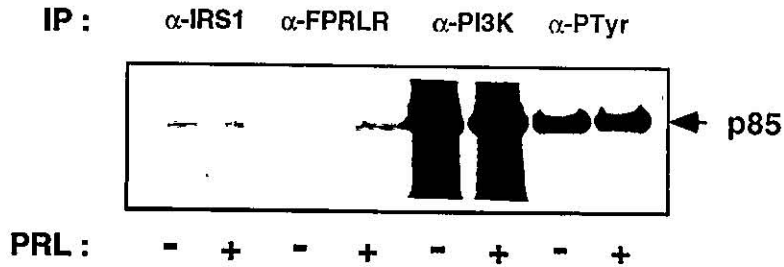
**B**



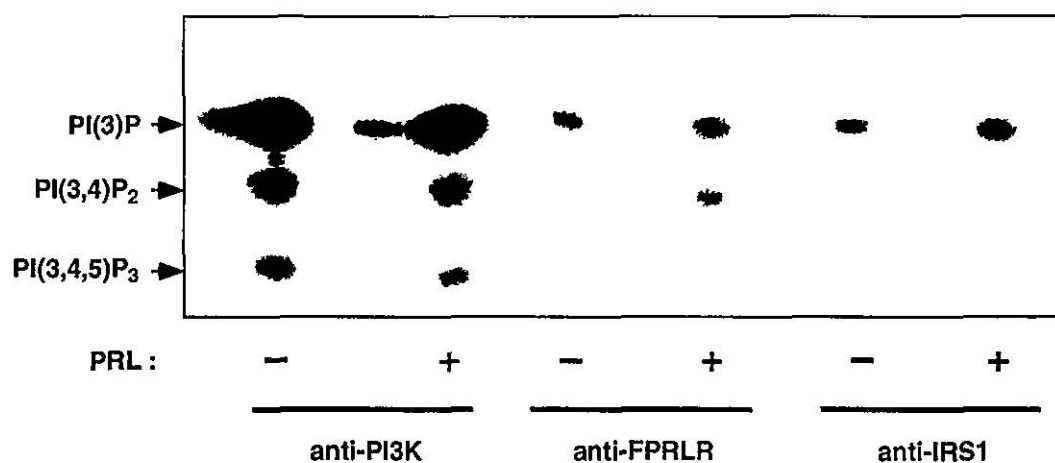
**Figura 10. Copurificación de proteínas fosforiladas en tirosina con PRLR.** Células 293-FPRLR ( $2 \times 10^7$  células por condición) fueron estimuladas con oPRL (400 ng/ml) y lisadas a distintos tiempos entre 0 y 60 minutos, según se indica. FPRLR y proteínas asociadas se purificaron mediante la columna de afinidad anti-FLAG M1. Las proteínas purificadas se separaron en geles de poliacrilamida-SDS, se transfirieron a membranas de PVDF y se analizaron mediante Western-blot. (A) Blot anti-fosfotirosina con el anticuerpo 4G10. (B) Blot anti-FLAG con el anticuerpo anti-FLAG M2. La migración de las proteínas de 85 y 185 KDa, así como de PRLR (p95 y p82) está indicada.

(Figura 11B) con el receptor de prolactina. Como se puede apreciar en la Figura 11 tanto la asociación de IRS1 (Figura 11A, carriles 2 y 3), como la de la subunidad reguladora de PI3K p85 (Figura 11B, carriles 2 y 3), fueron dependientes de prolactina.

Para confirmar los datos de fosforilación en tirosina de IRS1 y PI3K y su asociación al receptor inducida por PRL, se analizó la presencia de actividad PI3K en inmunocomplejos de FPRLR e IRS1. Con este fin, células 293-FPRLR se estimularon o no con PRL, se inmunoprecipitaron FPRLR, IRS-1 y PI3K de estas células y se realizó un ensayo de actividad PI3K *in vitro* en los inmunocomplejos. Un experimento representativo se muestra en la Figura 12, donde la presencia de actividad PI3K en los inmunocomplejos de FPRLR e IRS-1 se evidenció por la aparición de PI(3)P y PI(3,4)P<sub>2</sub> marcados con fosfato radiactivo. Esta actividad aumentó significativamente cuando las células habían sido estimuladas con PRL con respecto a las células no estimuladas. Este aumento en la actividad pareció deberse a un aumento en la cantidad de PI3K asociada al receptor inducido por PRL, puesto que la actividad total de la PI3K inmunoprecipitada no se modificó por la estimulación. Estos datos estarían de acuerdo con los resultados del Western-blot (Figura 11B), donde el tratamiento de las células con PRL indujo la asociación de PI3K al receptor de PRL.

**A****B**

**Figura 11. Coinmunoprecipitación de IRS1 y PI3K con PRLR.** Células 293-FPRLR ( $2 \times 10^7$  células por condición) fueron estimuladas o no con oPRL (400 ng/ml) durante 20 minutos. Los lisados celulares se sometieron a inmunoprecipitación con los anticuerpos anti-IRS1, anti-FLAG, anti-PI3K y anti-fosfotirosina, según se indica. Las proteínas contenidas en los inmunocomplejos se separaron en geles de poliacrilamida-SDS, se transfirieron a membranas de PVDF y se analizaron mediante Western-blot. (A) Blot anti-IRS1. (B) Blot anti-PI3K. La migración de IRS1 y p85 de PI3K está indicada.



**Figura 12. Actividad PI3K asociada a PRLR e IRS1. Células 293-FPRLR.** Células 293-FPRLR ( $2 \times 10^7$  células por condición) fueron estimuladas o no con oPRL (400 ng/ml) durante 20 minutos. Los lisados celulares se sometieron a inmunoprecipitación con los anticuerpos anti-IRS1, anti-FLAG y anti-PI3K, según se indica. En los inmunocomplejos se ensayó actividad PI3K en presencia de una mezcla de fosfoinosítidos (PI, PI(4)P, PI(4,5)P<sub>2</sub>) y ( $\gamma$ -<sup>32</sup>P)ATP. Los productos de la reacción se extrajeron con cloroformo:metanol y se separaron por cromatografía en capa fina. En la figura se muestra el autorradiograma de la cromatografía donde la migración de PI(3)P, PI(3,4)P<sub>2</sub> y PI(3,4,5)P<sub>3</sub> está indicada.

## **DISCUSSION**

## SEÑALIZACION INTRACELULAR DE PROLACTINA EN HIGADO.

Los resultados presentados en esta memoria muestran las primeras evidencias experimentales de la señalización celular de prolactina en hígado. Cuando hepatocitos aislados son estimulados con la hormona prolactina se observa que la proteína tirosina quinasa pp60<sup>c-src</sup> se asocia al receptor de prolactina. Estos resultados son similares a los obtenidos en células Nb2, donde se ha identificado otro miembro de la familia Src, p59<sup>fyn</sup>, asociado a las tres isoformas del receptor de prolactina expresadas (Clevenger y Medaglia, 1994). Sin embargo, en estas células la asociación de p59<sup>fyn</sup> es independiente de la presencia de ligando. La asociación y activación de distintos miembros de la familia Src por receptores de citoquinas ha sido demostrado en el caso del receptor de IL-2, que asocia y activa al menos tres miembros de la familia Src, como son Lck, Fyn y Lyn (Taniguchi, 1995).

Además de estimular la asociación, la unión de prolactina a sus receptores hepáticos induce la actividad tirosina quinasa de pp60<sup>c-src</sup>, lo que se demuestra por el incremento en su autofosforilación y en la fosforilación de la enolasa. La cinética de activación observada es similar a la demostrada para otros miembros de la familia Src en respuesta a citoquinas y factores de crecimiento (Courtneidge y col., 1993; Torigoe y col., 1992a). No obstante, el mecanismo molecular que explique la activación de pp60<sup>c-src</sup> por prolactina debe ser establecido por trabajos posteriores. El modelo de regulación de pp60<sup>c-src</sup> aceptado sugiere que en la forma inactiva de la quinasa un resto de tirosina en el extremo carboxilo (tirosina 527) se encuentra fosforilado e interaccionando intramolecularmente con el dominio SH2 y que esta interacción es estabilizada por una segunda unión intramolecular del dominio SH3 con una región aún no determinada (Erpel y col, 1995). Siguiendo este modelo, la activación de pp60<sup>c-src</sup> podría ocurrir por tres mecanismos distintos: i) defosforilación de la tirosina 527 en la región reguladora carboxilo-terminal; ii) competición por el dominio SH2 mediante una fosfotirosina con alta afinidad de unión; y iii) competición por el dominio SH3 con una secuencia rica en prolina (Erpel y Courtneidge, 1995).

Con nuestros datos no podemos descartar ninguno de los mecanismos de activación propuestos. Todas las isoformas de PRLR poseen una secuencia rica en prolina ('box 1') a la que podría unirse pp60<sup>c-src</sup> a través de su dominio SH3 y así activarse, aunque esta vía de activación aún no ha sido demostrada en ningún caso. La activación de pp60<sup>c-src</sup> por competición con fosfotirosina se ha demostrado en receptores con actividad tirosina quinasa propia, como PDGF (Mori y col., 1993). En este caso el receptor de prolactina debería estar fosforilado para asociar y activar pp60<sup>c-src</sup>, por ello, parece razonable pensar que el receptor de prolactina hepático podría asociar otra tirosina

quinasa, de la familia JAK o no, que fosforile al receptor creando un sitio al que podría unirse pp60<sup>C-src</sup> a través de su dominio SH2 y así activarse. A favor de esta hipótesis está el hecho de que la asociación constitutiva de JAK2 al receptor de prolactina es necesaria, pero no suficiente para producir una respuesta lactogénica y que la mutación de una tirosina carboxilo-terminal del receptor evita dicha respuesta (Lebrun y col., 1995a, 1995b). Si bien, en nuestros estudios no hemos detectado la presencia de JAK quinasas ni la fosforilación del receptor de prolactina.

Los resultados presentados en esta memoria muestran que en hepatocitos aislados de rata PRL produce un aumento en los niveles estacionarios de mRNA de los protooncogenes c-fos, c-jun y c-src. Este efecto es independiente de la síntesis de proteínas, puesto que se produjo tanto en presencia como en ausencia del inhibidor de traducción cicloheximida.

La expresión génica de los protooncogenes c-fos y c-jun es crítica en respuestas proliferativas inducidas por factores de crecimiento y citoquinas (Ryseck y col., 1988; Müller y col., 1984; Minami y Taniguchi, 1995). Los productos de estos protooncogenes son factores de transcripción que regulan la expresión de genes con secuencias AP1 o SRE en sus promotores (Curran y Franza, 1988). Por consiguiente, la modulación por PRL de la expresión de estos protooncogenes conlleva la regulación de otros genes con sitios AP1 y la inducción de respuestas proliferativas.

Las tirosina quinasas de la familia Src se han implicado en la activación de la vía de señalización de Ras que a través de Raf-1 y MAPK lleva a la expresión de c-fos y c-jun. En células Nb2 se ha observado la activación de Ras (Erwin y col., 1995; Clevenger y col., 1995) y Raf-1 (Clevenger y col., 1994) por PRL. Por otro lado, se ha comprobado una ruta de activación de c-myc iniciada por pp60<sup>C-src</sup> e independiente de Ras (Erpel y Courtneidge, 1995). Por todo ello, la activación de pp60<sup>C-src</sup> por PRL podría explicar el efecto sobre la expresión de c-fos, c-jun y c-myc hepatocitos.

EGF, PDGF, CSF-1 y algunas citoquinas (Sadowski y col., 1993; Lerner y col., 1993), incluyendo PRL (David y col., 1994), activan mediante fosforilación en tirosina el factor de transcripción p91-Stat1 que se ha visto que se une a una secuencia (SIE) en el promotor de c-fos (Fu y Zhang, 1993), de modo que podría regular su expresión de forma alternativa a la vía de MAPK (Silvennoinen y col., 1993). La fosforilación y activación de p91-Stat1 podría producirse por JAK o por Src quinasas.

Futuras investigaciones revelarán los mecanismos por los cuales los receptores de prolactina asocian y activan pp60<sup>C-src</sup>, así como las rutas de señalización que conducen a la regulación de la expresión génica por prolactina.

## **EFFECTO DE LA COEXPRESION DE LAS ISOFORMAS S-PRLR Y L-PRLR SOBRE LA INDUCCION DEL PROMOTOR DE $\beta$ -CASEINA POR PRL.**

Resultados previos del análisis de la capacidad de las isoformas S-PRLR y L-PRLR para inducir la transcripción de los genes de las proteínas de la leche en distintas líneas celulares, demuestran que, aunque ambas isoformas unen prolactina con la misma afinidad, sólo la isoforma L-PRLR es activa en estos ensayos (Lesueur y col., 1991; Lebrun y col., 1995a). También se ha demostrado que ambas isoformas son capaces de asociar y activar JAK2 y p91-Stat1 (Lebrun y col., 1995a).

Los experimentos presentados en esta memoria aportan dos novedades, una es la de su realización en una línea celular de glándula mamaria, tejido en el que se sintetizan las proteínas de la leche de forma dependiente de PRL, y otra es la de la coexpresión de las isoformas de PRLR, que ocurre de manera natural tanto en glándula mamaria como en todos los tejidos de rata estudiados (Nagano y Kelly, 1994).

Los resultados obtenidos muestran que, al igual que en otras líneas celulares, en células de glándula mamaria la isoforma S-PRLR no es funcional en la inducción de la expresión de proteínas de la leche, y que su coexpresión con la isoforma L-PRLR causa una atenuación o inhibición de la respuesta a prolactina promovida por ésta, dependiente de la proporción de ambas isoformas expresada.

Nuestros resultados podrían apoyar la hipótesis de la dimerización de PRLR promovida por PRL para iniciar su señalización en cuanto a que la coexpresión de las isoformas S-PRLR y L-PRLR haría posible la formación de heterodímeros inactivos en inducción del promotor de  $\beta$ -caseína. De este modo, el aumento de la expresión de S-PRL y la disminución de la expresión de L-PRL, incrementaría la probabilidad de formación de heterodímeros en detrimento de la formación de homodímeros activos de L-PRLR y, por tanto, reduciendo la magnitud de la respuesta lactogénica.

Muchos de los receptores de citoquinas activos están compuestos por al menos dos subunidades, una subunidad  $\alpha$  específica de ligando y una subunidad  $\beta$  común a otros receptores de la misma familia. Otros receptores constan de una sola cadena que forma homodímeros de forma dependiente de ligando. En el caso de receptores con subunidades  $\beta$ , son éstas y no las subunidades  $\alpha$  las que asocian las tirosina quinasas necesarias para su señalización intracelular. En cualquier caso, parece claro que es necesaria la dimerización u oligomerización de los receptores para la iniciación de las señales (revisado por Ihle y col., 1994).

En el caso de PRLR no se ha demostrado claramente su dimerización de forma dependiente de ligando, pues aún no se ha conseguido el patrón de difracción de rayos X de un hipotético heterotrímero hormona-(receptor)<sub>2</sub>. No obstante, hay evidencias



indirectas que apoyan la idea de que la dimerización de PRLR es necesaria para iniciar la señalización intracelular, como son la activación de JAK2 y p59<sup>fyn</sup>, o la inducción de proliferación celular mediante anticuerpos anti-PRLR bivalentes, pero no con anticuerpos monovalentes (Rui y col., 1994; Clevenger y Medaglia, 1994).

La isoforma S-PRLR es inactiva en respuestas celulares mediadas por las isoformas L-PRLR y Nb2-PRLR estudiadas (O'Neal y Yu-Lee, 1994; Lebrun y col., 1995a). Este hecho no descarta la existencia de funciones exclusivamente debidas a S-PRLR sólo o junto con las otras isoformas de PRLR, de modo que la coexpresión de diferentes isoformas de PRLR ampliaría la variedad de respuestas inducidas por prolactina. Nuestros estudios son preliminares y se han centrado en el análisis de respuestas celulares muy concretas, de modo que sería de gran interés profundizar en el estudio de la funcionalidad de las diferentes isoformas del receptor de prolactina en ésta y en otras respuestas celulares inducidas por prolactina

#### **ASOCIACION Y FOSFORILACION EN TIROSINA DE IRS1 Y PI3K MEDIADA POR EL RECEPTOR DE PROLACTINA.**

Los resultados obtenidos en células 293 muestran que las proteínas IRS1 y PI3K se asocian al receptor de prolactina y son fosforiladas en tirosina en respuesta a prolactina. Como consecuencia de ello, una actividad PI3K coimmunoprecipita con PRLR e IRS1 cuando las células son estimuladas con prolactina. Ambas proteínas han sido previamente identificadas asociadas a otros receptores de factores de crecimiento y citoquinas (Fry, 1994).

Al igual que prolactina, GH, LIF, IFN- $\gamma$  e IFN- $\alpha$  activan JAK quinasas (revisado por Taniguchi, 1995) a la vez que inducen la fosforilación en tirosina de IRS1. La proteína IRS1 parece estar implicada de manera general en la señalización iniciada por receptores de citoquinas. Se sabía que IL-4 inducía la fosforilación en tirosina de la proteína 4PS, antigénicamente relacionada con IRS1 y con la misma función, y de IRS1 (Wang y col., 1993), así como la activación de PI3K mediante su asociación al complejo receptor-4PS (Wang y col., 1992). Recientemente se ha comprobado que otras citoquinas, como son GH, LIF, IFN- $\gamma$  e IFN- $\alpha$ , inducen la fosforilación en tirosina de IRS1 y su asociación con PI3K (Ridderstrale y col., 1995; Argetsinger y col., 1995; Uddin y col., 1995).

El significado de que la prolactina estimule la fosforilación en tirosina de IRS1 implica transmitir la señal hormonal a una proteína común donde pueden interaccionar proteínas con dominios SH2 que específicamente reconocen determinadas fosfotirosinas

presentes en IRS1, como son p85 de PI3K, GRB2, Nck o la tirosina fosfatasa SHPTP2 (revisado por White, 1994), iniciándose así diferentes rutas de señalización. Las distintas respuestas celulares a cada citoquina en particular podrían depender del grado de fosforilación de IRS1 o de los restos de tirosina fosforilados en cada caso por las diferentes tirosina quinasas activadas, así como del repertorio celular de proteínas señalizadoras.

Nuestros resultados no nos permiten conocer la forma de interacción de IRS1 con el receptor de prolactina. En los estudios con GH hay coincidencia entre las secuencias necesarias para la activación de JAK2 y la fosforilación de IRS1, además de observarse coprecipitación de ambas proteínas (Argetsinger y col., 1995). Por ello, IRS1 parece estar asociada al complejo receptor-JAK2, bien a través de JAK2, o bien uniéndose directamente al receptor. La no presencia de JAK2 en nuestros resultados puede deberse a una baja expresión en células 293, puesto que los experimentos de activación de esta quinasa por PRL requieren transfección con el cDNA de JAK2 (Lebrun y col., 1995a, 1995b).

Los resultados presentados en esta memoria muestran la coprecipitación de actividad PI3K con IRS1 y PRLR de forma dependiente de ligando, y que tanto IRS1 como PI3K coinmunoprecipitan con PRLR, lo que sugiere la formación de un complejo en el que se hallan las tres proteínas. No obstante, los datos de copurificación y fosforilación en tirosina de las tres proteínas parecen oponerse a la unión y activación de PI3K por IRS1, ya que, aunque la fosforilación en tirosina de p85 no parece regular la actividad de PI3K, p85 aparece fosforilada en tirosina antes que IRS1. Esto se explicaría si PI3K se une directamente a PRLR y la fosforilación de IRS1 activada por PRL no se relaciona con la activación de PI3K. En PRLR hay una tirosina cercana al dominio transmembrana en una secuencia YSMM donde podría unirse p85, puesto que los motivos consenso de unión para sus dominios SH2 son YXXM/YMXM (Cantley y col., 1991).

PI3K se encuentra implicada en la señalización celular de numerosos ligandos que activan tirosina quinasas, entre ellos IL-2, EPO, IL-3, IL-4, GM-CSF, GH, LIF, IFN- $\gamma$  e IFN- $\alpha$  (Fry, 1994; Argetsinger y col., 1995; Uddin y col., 1995). La mayoría activan PI3K mediante su asociación a IRS1 a través de fosfotirosina de IRS1 y los dominios SH2 de p85, aunque en el caso de IL-2 o PDGF la asociación de PI3K a sus receptores es directa (Truitt y col., 1994; Coughlin y col., 1989; Kazlauskas y Cooper, 1989).

La activación de PI3K juega un papel muy importante en la transducción de señales de numerosos factores de crecimiento y citoquinas, y en algunos casos se ha comprobado que es totalmente necesaria para la inducción de señales mitogénicas (Fry, 1994). Por ello, los efectos mitogénicos inducidos por prolactina podrían deberse en parte a la activación de PI3K.

Los resultados presentados en esta memoria muestran por primera vez la asociación de las proteínas pp60<sup>c-src</sup>, IRS1 y PI3K al receptor de prolactina, aportando así nuevos e interesantes datos sobre la señalización intracelular mediada por los receptores de prolactina. Estos resultados, indican que la prolactina, al igual que otras citoquinas, inicia distintas rutas de señalización intracelular mediante la asociación de sus receptores con diferentes proteínas con actividad tirosina quinasa (revisado por Taniguchi, 1995), formando complejos multiproteicos asociados al receptor para la iniciación de las señales intracelulares.

## **CONCLUSIONES**

Los resultados presentados en esta memoria demuestran que la acción celular de la hormona prolactina se inicia estimulando la asociación de proteínas del interior de la célula a sus receptores.

1. La acción celular de la hormona prolactina en hígado es iniciada, al menos en parte, estimulando la asociación de la proteína tirosina quinasa pp60<sup>c-src</sup> al receptor de prolactina y la activación de su actividad tirosina quinasa.

2. La hormona prolactina estimula en hígado la expresión génica de los protooncogenes nucleares c-fos y c-jun, y del protooncogen c-src de manera independiente de la síntesis de proteínas. Estos resultados sugieren que la prolactina regula la expresión de genes con secuencias AP1 en sus promotores y tiene un papel estimulador en la proliferación de los hepatocitos.

3. En células de glándula mamaria la coexpresión de la isoforma corta con la isoforma larga del receptor de prolactina silencia el efecto de la prolactina sobre la inducción del promotor de  $\beta$ -caseína mediada por la isoforma larga.

4. Por último, en la señalización intracelular de la hormona prolactina, al igual que ocurre con insulina, IL-4, GH, LIF, IFN- $\gamma$  e IFN- $\alpha$ , están implicadas las proteínas IRS1 y PI3K mediante su fosforilación en tirosina y su asociación al receptor inducidas por la hormona.

## **BIBLIOGRAFIA**

Akira, S., Nishio, Y., Inoue, M., Wang, X.J., Wei, S., Matsusaka, T., Yoshida, K., Sudo, T., Naruto, M., Kishimoto, T. (1994) Molecular cloning of APRF, a novel IFN-stimulated gene factor 3 p91-related transcription factor involved in the gp130-mediated signaling pathway. *Cell* 77:63-71.

Ali, S., Pellegrini, I., Kelly, P.A. (1991) A prolactin-dependent immune cell line (Nb2) expresses a mutant form of prolactin receptor. *J. Biol. Chem.* 266:20110-20117.

Amit, T., Barkey, R.J., Gavish, M., Youdim, M.B.H. (1984) Induction of prolactin (PRL) receptors by PRL in the rat lung and liver. Demonstration and characterization of a soluble receptor. *Endocrinology* 114:545-552.

Argetsinger, L.S., Hsu, G.W., Myers, M.G., Billestrup, N., White, M.F., Carter-Su, C. (1995) Growth hormone, interferon- $\gamma$ , and leukemia inhibitory factor promoted tyrosyl phosphorylation of insulin receptor substrate-1. *J. Biol. Chem.* 270:14685-15692.

Armstrong, D.T., Knudsen, K.Z., Miller, L.S. (1970) Effects of prolactin upon cholesterol metabolism and progesterone biosynthesis in corpora lutea of rats hypophysectomized during pseudopregnancy. *Endocrinology* 86:634-641.

Auger, K.R., Serunian, L.A., Soltoff, S.P., Libby, P., Cantley, L.C. (1989) PDGF-dependent tyrosine phosphorylation stimulates production of novel polyphosphoinositides in intact cells. *Cell* 57: 167-175.

Aviv, H., Leder, P. (1972) Purification of biologically active globin messenger RNA by chromatography on oligothymidilic acid-cellulose. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 69:1408-1412.

Baroni, C. (1967) Thymus, peripheral lymphoid tissues and immunological responsiveness of the pituitary dwarf mouse. *Experientia* 23:282-283.

Baxter, R.C., Zaltsman, Z., Turtle, J.R. (1984) Rat growth hormone (GH) but not prolactin (PRL) induces both GH and PRL receptors in female rat liver. *Endocrinology* 114:1893-1901.

Bazan, J.F. (1989) A novel family of growth factor receptors: a common binding domain in the growth hormone, prolactin, erythropoietin and IL-6 receptors, and the p75 IL-2 receptor beta-chain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 164:788-795.

Bazan, J.F. (1990a) Haemopoietic receptors and helical cytokines Immunol. Today 11:350-354.

Bazan, J.F. (1990b) Structural design and molecular evolution of a cytokine receptor superfamily. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 87:6934-6938.

Bazan, J.F. (1991) Neuropoietic cytokines in the hematopoietic. Fold Neuron 7:197-208.

Bergeron, J.J.M., Posner, B.I., Josefsberg, Z., Sikstrom, R. (1978) Intracellular polypeptide hormone receptors. The demonstration of specific binding sites for insulin and human growth hormone in Golgi fractions isolated from the liver of female rats. J. Biol. Chem. 253:4058-4066.

Bergeron, J.J.M., Searle, N., Khan, M.N., Posner, B.I. (1986) Differential and analytical subfractionation of rat liver components internalizing insulin and prolactin. Biochemistry 25:1756-1764.

Berra, E., Diaz-Meco, M.T., Domínguez, I., Municio, M.M., Sanz, L., Lozano, J., Chapkin R.S., Moscat, J. (1993) Protein kinase C  $\zeta$  isoform is critical for mitogenic signal transduction . Cell 74:555-563.

Bignon, C., Daniel, N., Kermabon, A.Y., Djiane, J. (1995) Prolactin induces growth inhibition and promotes differentiation of CHO cells stably transfected with prolactin receptor complementary DNA. FEBS Lett. 358:84-88.

Bolen, J.B., Thompson ,P.A., Eiseman, E., Horak, I.D., (1991) Expression and interactions of the Src family of tyrosine protein kinases in T lymphocytes. Adv. Cancer Res. 57:103-149.

Boutin, J.M., Edery, M., Shiota, M., Jolicoeur, C., Leseur, L., Ali, S., Gould, D., Djiane, J., Kelly, P.A. (1989) Identification of a cDNA encoding a long form of prolactin receptor in human hepatoma and breast cancer cells. Mol. Endocrinol. 3:1455-1461.

Boutin, J.M., Jolicoeur, C., Okamura, H., Gagnon, J., Edery, M., Shiota, M., Banville, D., Dusanter-fourth, I., Djiane, J., Kelly, P.A. (1988) Cloning and expression of the rat prolactin receptor, a member of the growth hormone/prolactin receptor gene family. Cell 53:69-77.

Buckley, A.R., Putnam, C., Russell, D.H.(1985) Prolactin is a tumor promoter in rat liver. Life Sci. 37:2569-2575.



Campbell, G.S., Argetsinger, L.S., Ihle, N.I., Kelly, P.A., Rillema, J.A., Carter-Su, C. (1994) Activation of Jak2 tyrosine kinase by prolactin receptors in Nb2 cells and mouse mammary gland explants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:5232-5236.

Cantley, L.C., Auger, K.R., Carpenter, C., Duckworth, B., Graziani, A., Kapeller, R., Soltoff, S. (1991) Oncogenes and signal transduction. *Cell* 64: 281-302.

Clevenger, C.V., Medaglia, M.V. (1994) The protein tyrosine kinase p59<sup>fyn</sup> is associated with prolactin (PRL) receptor and is activated by Prl stimulation of T-lymphocytes. *Mol. Endocrinol* 8:674-681.

Clevenger, C.V., Ngo, W., Sokol, D.L., Luger, S.M., Gewirtz, A.M. (1995) Vav is necessary for prolactin-stimulated proliferation and is translocated into the nucleus of a T-cell line. *J. Biol. Chem.* 270:13246-13253.

Clevenger, C.V., Torigoe, T., Reed, J.C. (1994) Prolactin induces rapid phosphorylation and activation of prolactin receptor-associated Raf-1 kinase in a T-cell line. *J Biol Chem* 269:5559-5565.

Coughlin, S.R., Escobedo, J.A., Williams, L.T. (1989) Role of phosphatidylinositol kinase in PDGF receptor signal transduction. *Science* 243:1191-1194.

Courtneidge, S.A., Dhand, R., Pilat, D., Twamley, G.M., Waterfield, M.D., Roussel, M.F. (1993) Activation of Src family kinases by colony stimulating factor-1, and their association with its receptor. *EMBO J.* 12:943-950.

Curran, T., Franza, B.R. (1988) Fos and Jun: the AP-1 connection. *Cell* 55:395-397.

D'Andrea, A.D., Lodish, H.F., Wong, G.G. (1989) Expression cloning of the murine erythropoietin receptor. *Cell* 57:277-285.

David, M., Petricoin, E.F., Igarashi, K., Feldman, G.M., Finbloom, D.S., Lerner, A.C. (1994) Prolactin activates the interferon-regulated p91 transcription factor and the Jak2 kinase by tyrosine phosphorylation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:7174-7178.

Djiane, J., Delouis, C., Kelly, P.A. (1982) Prolactin receptor turnover in explants of pseudopregnant rabbit mammary gland. *Mol. Cell. Endocrinol.* 25:163-170.

Djiane, J., Durand, P., Kelly, P.A. (1977) Evolution of prolactin receptors in rabbit mammary gland during pregnancy and lactation. *Endocrinology* 100:1348-1356.

Djiane, J., Kelly, P.A., Houdebine, L.M. (1980) Effects of lysosomotropic agents, cytochalasin B and colchicine on the "down-regulation" of prolactin receptors in mammary gland explants. *Mol. Cell. Endocrinol.* 18:87-98.

Dusanter-Fourt, J., Muller, O., Ziemiecki, A., Mayeux, P., Drucker, B., Djiane, J., Wilks, A., Harpur, A.G., Ficher, S., Gisselbrecht, S. (1994) Identification of JAK protein tyrosine kinases as signaling molecules for prolactin. *EMBO J.* 13:2583-2591.

Erpel, T., Superti-Furga, G., Courtneidge, S.A. (1995) Mutational analysis of the Src SH3 domain: the same residues of the ligand binding surface are important for intra- and intermolecular interactions. *EMBO J.* 14:963-975.

Erpel, T., Courtneidge, S.A. (1995) Src family protein tyrosine kinases and cellular signal transduction pathways. *Curr. Op. Cell. Biol.* 7:176-182.

Erwin, R.A., Kirken, R.A., Malabarba, M.G., Farrar, W.L., Rui, H. (1995) Prolactin activates Ras via signaling proteins SHC, growth factor receptor bound 2, and son of sevenless. *Endocrinology* 136:3512-3518.

Fry, M.J. (1994) Structure, regulation and function of phosphoinositide 3-kinases. *Biochim. Biophys. Acta* 1226:237-268.

Fu, X.Y. (1992) A Transcription factor with SH2 and SH3 domains is directly activated by an interferon  $\alpha$ -induced cytoplasmic protein tyrosine kinase(s). *Cell* 70:323-335.

Fu, X.Y., Zhang, J.J. (1993) Transcription factor p91 interacts with the epidermal growth factor receptor and mediates activation of the c-fos gene promoter. *Cell* 74:1135-1145.

Fuh, G., Mulkerrin, M.G., Bass, S., McFarland, N., Brochier, M., Bourell, J.H., Light, D.R., Wells, J.A. (1990) The human growth hormone receptor. Secretion from *Escherichia coli* and disulfide bonding pattern of the extracellular binding domain. *J. Biol. Chem.* 265:3111-3115.

Fukunaga, R., Ishizaka-Ikeda, E., Seto, Y., Nagata, S. (1990) Expression cloning of a receptor for murine granulocyte colony-stimulating factor. *Cell* 61:341-350.

Fumagalli, S., Totty, N., Hsuan, J.J., Courtneidge, S.A. (1994) A target for Src in mitosis. *Nature* 368:871-874.

Gaddykurten, D., Richards, J.S. (1991) Regulation of alpha 2-macroglobulin by luteinizing hormone and prolactin during cell differentiation in the rat ovary. *Mol. Endocrinol.* 5: 1280-1291.

Gasser, F., Mulsant, P., Gillois, M. (1985) Long-term multiplication of the Chinese hamster ovary (CHO) cell line in a serum-free medium. *In Vitro Cell. Dev. Biol.* 21: 588-592.

Gearing, D.P., King, J.A., Gough, N.M., Nicola, N.A. (1989) Expression cloning of a receptor for human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *EMBO J.* 8:3667-3676.

Goodwin, R.G., Friend, D., Ziegler, S.F., Jerzy, R., Falk, B.A., Gimpel, S., Cosman, D., Dower, S.K., March, C.J., Namen, A.E., Park, L.S. (1990) Cloning of the human and murine interleukin-7 receptors: demonstration of a soluble form and homology to a new receptor superfamily. *Cell* 60:941-951.

Gouilleux, F., Pallard, C., Dusanter-Fourt, I., Wakao, H., Haldosen, L.A., Norstedt, G., Levy, D., Groner, B. (1995) Prolactin, growth hormone, erythropoietin and granulocyte-macrophage colony stimulating factor induce MGF-Stat5 DNA binding activity. *EMBO J.* 14:2005-2013.

Gouilleux, F., Wakao, H., Mundt, M., Groner, B. (1994) Prolactin induces phosphorylation of Tyr694 of Stat5 (MGF), a prerequisite for DNA binding and induction of transcription. *EMBO J.* 13:4361-4369.

Goujon, L., Allevato, G., Simonin, G., Paquereau, L., Le Cam, A., Clark, J., Nielsen, J.H., Djiane, J., Postel-Vinay, M.C., Edery, M., Kelly, P.A. (1994) Cytoplasmic sequences of the growth hormone receptor necessary for signal transduction. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:957-961.

Gould, K.L., Hunter, T. (1988) Platelet-Derived growth factor induces multi-sites phosphorylation of pp60<sup>c-src</sup> and increases its protein kinase activity. *Mol. Cell. Biol.* 8:3345-3356.

Gout, P.W., Beer, C.T., y Noble, R.L. (1980) Prolactin-stimulated growth of cell cultures established from malignant Nb rat lymphomas. *Cancer Res.* 40:2433-2436.

Graham, F.L., Smiley, J., Russell, W.C., Nairn, R. (1977) Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J. Gen. Virol.* 36:59-74.

Gu, Y., Jayatilak, P.G., Parmer, T.G., Gauldie, J., Fey, G.H., Gibori, G. (1992) Alpha 2-macroglobulin expression in the mesometrial decidua and its regulation by decidual luteotropin and prolactin. *Endocrinology* 131:1321-1328.

Gulbins, E., Coggeshall, K.M., Baier, G., Katzav, S., Burn, P., Altman, A., (1993) Tyrosine kinase-stimulated guanine nucleotide exchange activity of Vav in T cell activation. *Science* 260: 822-825.

Guyette, W.A., Matusik, R.J., Rosen, J.M. (1979) Prolactin-mediated transcriptional and post-transcriptional control of casein gene expression. *Cell* 17:1013-1023.

Haagensen, D.E., Mazovjian (1986) En "Diseases and the Breast" (C.D. Haagensen, ed.), pp. 474-500. Saunders, Philadelphia.

Hall, A.K., Rao, M.S. (1992) Cytokines and neurokines: related ligands and related receptors trends. *Neurosci.* 15:35-37.

Harrison, T., Graham, F., Williams, J. (1977) Host-range mutants of adenovirus type 5 defective for growth in HeLa cells. *Virology* 77:319-329.

Hartmann, D.P., Holaday, J.W., Bernton, E.W. (1989) Inhibition of lymphocyte proliferation by antibodies to prolactin. *FASEB J.* 3:2194-2202.

Hatakeyama, M., Tsudo, M., Minamoto, S., Kono, T., Doi, T., Miyata, T., Miyasaka, M., Taniguchi, T. (1989) Interleukin-2 receptor beta chain gene: generation of three receptor forms by cloned human alpha and beta chain cDNA's. *Science* 244:551-556.

Hems, R., Ross, B.D., Berry, M.N., Krebs, H.A. (1966) Gluconeogenesis in the perfused rat liver. *Biochem. J.* 101:284-292.

Herbomel, P., Bourachot, B., Yaniv, M. (1984) Two distinct enhancers with different cell specificities coexist in the regulatory region of polyoma. *Cell* 39:653-662.

Hibi, M., Murakami, M., Saito, M., Hirano, T., Taga, T., Kishimoto, T. (1990) Molecular cloning and expression of an IL-6 signal transducer, gp130. *Cell* 63:1149-1157.

Hughes, J.P., Elsholtz, H.P., Friesen, H.G. (1985) En "Polypeptide Hormone Receptors" (B.I. Posner, ed.), pp. 157-190.

Ihle, J.N., Witthuhn, B.A., Quelle, F.W., Yamamoto, K., Thierfelder, W.E., Kreider, B., Silvennoinen, O. (1994) Signalling by the cytokine receptor superfamily: JAKs and STATs. *TIBS* 19:222-227.

Irvine, R.F. (1992) Inositol lipids in cell signalling. *Curr. Opin. Cell. Biol.* 4:212-219.

Itoh, N., Yonehara, S., Schreurs, J., Gorman, D.M., Maruyama, K., Ishii, A., Yahara, I.K., Arai, K., Miyajima, A. (1990) Cloning of an interleukin-3 receptor gene: a member of a distinct receptor gene family. *Science* 247:324-327.

Jolicoeur, C., Boutin, J.M., Okamura, H., Raguet, S., Djiane, J., Kelly, P.A. (1989) Multiple regulation of prolactin receptor gene expression in rat liver. *Mol. Endocrinol.* 3:895-900.

Karnitz, L.M., Abraham, R.T. (1995) Cytokine receptor signaling mechanisms. *Curr. Opin. Immunol.* 7:320-326

Kazlauskas, A. (1994) Receptor tyrosine kinases and their targets. *Curr. Opin. Gen. Dev.* 4:5-14.

Kazlauskas, A., Cooper, A. (1989) Autophosphorylation of the PDGF receptor in the kinase insert region regulates interactions with cell proteins. *Cell* 58:1121-1133.

Kelly, P.A., Ali, S., Rozakis, M., Goujon, L., Nagano, M., Pellegrini, I., Gould, D., Djiane, J., Edery, M., Finidori, J., Postel-Vinay, M.C. (1993) The growth hormone/Prolactin receptor family. *Rec. Prog. Horm. Res.* 48:123-1..

Kelly, P.A., Seguin, C., Cusan, L., Labrie, F. (1980) Stimulatory effect of luteinizing hormone and human chorionic gonadotropin on testicular prolactin receptor levels. *Biol. Reprod.* 23:924-928.

Kitamura, T., Sato, N., Arai, K.I., Miyajima, A. (1991) Expression cloning of the human IL-3 receptor cDNA reveals a shared beta subunit for the human IL-3 and GM-CSF receptors. *Cell* 66:1175-1184.

Kledzik, G.S., Marshall, S., Campbell, A.A., Gelato, M., Meites, J. (1976) Effects of castration, testosterone, estradiol, and prolactin on specific prolactin-binding activity in ventral prostate of male rats. *Endocrinology* 98:373-379.

Kypta, R.M., Hemming, A., Courtneidge, S.A. (1988) Identification and characterization of p59<sup>fyn</sup> (a src-like protein tyrosine kinase) in normal and polyoma virus transformed cells. *EMBO J.* 7:3837-3844.

Lerner, A.C., David, M., Feldman, G.M., Igarashi, K.I., Hackett, R.H., Webb, D.S.A., Sweitzer, S.M., Petricoin, E.F., Finblom, D.S. (1993) Tyrosine phosphorylation of DNA binding proteins by multiple cytokines. *Science* 261:1730-1733.

Lebrun, J.J., Ali, S., Sofer, L., Kelly, P.A. (1994) Prolactin induced proliferation of Nb2 cells involved tyrosine phosphorylation of the prolactin receptor and its associated tyrosine kinase JAK2. *J. Biol. Chem.* 269:14021-14026.

Lebrun, J.J., Ali, S., Goffin, V., Ullrich, A., Kelly, P.A. (1995) A single phosphotyrosine residue of the prolactin receptor is responsible for activation of gene transcription. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92:4031-4035.

Lebrun, J.J., Ali, S., Ullrich, A., Kelly, P.A. (1995) Proline-rich sequence-mediated Jak2 association to the prolactin receptor is required but not sufficient for signal transduction. *J. Biol. Chem.* 270:10664-10670.

Lesueur, L., Edery, M., Ali, S., Paly, J., Kelly, P.A. (1991) Comparison of long and short forms of the prolactin receptor on prolactin-induced milk protein gene transcription. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:824-828.

Lesueur, L., Edery, M., Paly, J., Clark, J., Kelly, P.A., Djiane, J. (1990) Prolactin stimulates milk protein promoter in CHO cells cotransfected with prolactin receptor cDNA. *Mol. Cell. Endocrinol.* 71:R7-R12.

Matera, L., Cesano, A., Muceloli, G., Veglia, F. (1990) Modulatory effect of prolactin on the DNA synthesis rate and NK activity of large granular lymphocytes. *Int. J. Neurosci.* 51:265-267.

McCormick, F. (1994) Activators and effectors of Ras p21 proteins. *Curr. Opin. Gen. Dev.* 4:71-76.

Minami, Y., Taniguchi, T. (1995) IL-2 signaling: recruitment and activation of multiple protein tyrosine kinases by the components of the IL-2 receptor. *Curr. Opin. Cell. Biol.* 7:156-162.

Miura, Y., Miura, O., Ihle, J.N., Aoki, N. (1994) Activation of the mitogen-activated protein kinase pathway by the erythropoietin receptor. *J. Biol. Chem.* 269:29962-29969.

Moodie, S.A., Willumsen, B.M., Weber, M.J., Wolfman, A. (1993) Complexes of Ras-GTP and mitogen-activated protein kinase kinase. *Science* 260:1658-1661.

Mori, S., Rönnstrand, L., Yokote, K., Engström, A., Courtneidge, S.A., Claesson-Welsh, L., Heldin, C.H. (1993) Identification of two juxtamembrane autophosphorylation sites in the PDGF  $\beta$ -receptor. Involvement in the interaction with Src family tyrosine kinases. *EMBO J.* 12:2257-2264.

Mosley, B., Beckmann, M.P., March, C.J., Idzerda, R.L., Gimpel, S.D., VandenBos, T., Friend, D., Alpert, A., Anderson, D., Jackson, J., Wignall, J.M., Smith, C., Gallis, B., Sims, J.E., Urdal, D., Widmer, M.B., Cosman, D., Park, L.S. (1989) The murine interleukin-4 receptor: molecular cloning and characterization of secreted and membrane bound forms. *Cell* 59:335-348.

Mukherjee, P., Mastro A.M., Hymer, W.C. (1990) Prolactin induction of interleukin-2 receptors on rat splenic lymphocytes. *Endocrinology* 126:88-94.

Müller, R., Bravo, R., Burckhardt, J., Curran, T. (1984) Induction of c-fos gene and protein by growth factors precedes activation of c-myc. *Nature* 312:716-720.

Murphy, L.C., Lee-Wing, M., Goldenberg, G.J., Shiu, R.P.C. (1987a) Expression of the gene encoding a prolactin-inducible protein by human breast cancers in vivo: correlation with steroid receptor. *Cancer Res.* 47:4160-4164.

Murphy, L.C., Tsuyuki, D., Myal, Y., Shiu R.P.C. (1987b) Isolation and sequencing of a cDNA clone for a prolactin-inducible protein (PIP). Regulation of PIP gene expression in the human breast cancer cell line, T-47D. *J. Biol. Chem.* 262:15236-15241.

Nagano, N., Kelly, P.A. (1994) Tissue distribution and regulation of rat prolactin receptor gene expression. *J. Biol. Chem.* 269:13337-13345.

Nagy, E., Berczi, I., Friesen, H.G. (1983) Regulation of immunity in rats by lactogenic and growth hormones. *Acta Endocrinol. Copenh.* 102:351-357.

Nakanishi, H., Brewer, K.A., Exton, J.H. (1993) Activation of the  $\zeta$  Isozyme of Protein Kinase C by Phosphatidylinositol 3,4,5-Trisphosphate. *J. Biol. Chem.* 268:13-16.



Niall, H.D., Hogan, M.L., Sauer, R., Rosenblum, I.Y., Greenwood, F.C. (1971) Sequences of pituitary and placental lactogenic and growth hormones: evolution from a primordial peptide by gene reduplication. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 68:866-870.

Nicoll, C.S., Bern, H.A. (1972) In "lactogenic Hormones" (G.W.E. Wolstenholme and J. Knight, eds.) pp. 299-317.

Nicoll, C.S., Herbert, M.J., Russell, S.M. (1985) Lactogenic hormones stimulate the liver to secrete a factor that acts synergistically with prolactin to promote growth of the pigeon crop-sac mucosal epithelium in vivo. *Endocrinology* 116:1449-1453.

Okamura, H., Zachwieja, J., Raguet, S., Kelly, P.A. (1989) Characterization and application of monoclonal antibodies to the prolactin receptor. *Endocrinology* 124:2499-2508.

O'Neal, K.D., Yu-Lee, L. (1994) Differential signal transduction of the short, Nb2, and long prolactin receptors. *J. Biol. Chem.* 269:26076-26082.

Orian, J.M., Snibson, K., Stevenson, J.L., Brandon, M.R., Herington, A.C. (1991) Elevation of growth hormone (GH) and prolactin receptors in transgenic mice expressing ovine GH. *Endocrinology* 128: 1238-1246.

Pawson, T. (1995) Protein modules and signalling networks. *Nature* 373:573-579.

Pellegrini, I., Ali, S., Lebrun, J.J., Kelly, P.A. (1992) Expression of prolactin and its receptor in human lymphoid cells. *Mol. Endocrinol.* 6:1023-1031.

Posner, B.I., Kelly, P.A., Friesen, H.G. (1974) Induction of a lactogenic receptor in rat liver: influence of estrogen and the pituitary. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 71:2407-2410.

Postel-Vinay, M.C., Belair, L., Kayser, C., Kelly, P.A., Djiane, J. (1991) Identification of prolactin and growth hormone binding proteins in rabbit milk. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 88:6687-6690.

Ralston, R., Bishop, J.M. (1985) The product of the proto-oncogene c-src is modified during the cellular response to Platelet-Derived Growth Factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:7845-7849.



Richards, J.F. (1975) Ornithine decarboxylase activity in tissues of prolactin-treated rats. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 63:292-299.

Ridderstrale, M., Degerman, E., Tornqvist, H. (1995) Growth hormone stimulates the tyrosine phosphorylation of the insulin receptor substrat-1 and its association with phosphatidylinositol 3-kinase in primary adipocytes. *J. Biol. Chem.* 270:3471-3474.

Rose, T.M., Bruce, A.G. (1991) Oncostatin M is a member of a cytokine family that includes leukemia-inhibitory factor, granulocyte colony-stimulating factor, and interleukin 6. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:8641-8645.

Rothenberg, P.L., Lane, W.S., Backer, J.M., White, M.F., Kahn, C.R. (1991) Purification and partial sequence analysis of pp185, the major cellular substrate of the insulin receptor tyrosine kinase. *J. Biol. Chem.* 266:8302-8311.

Rui, H., Kirken, R.A., Farrar, W.L. (1994a) Activation of receptor-associated tyrosine kinase JAK2 by prolactin. *J. Biol. Chem.* 269:5364-5368.

Rui, H., Lebrun, J.J., Kirken, R.A., Kelly, P.A., Farrar, W.L. (1994b) JAK2 activation and cell proliferation induced by antibody-mediated prolactin receptor dimerization. *Endocrinology* 135:1299-1306.

Ryseck, R.P., Hirai, S.I., Yaniv, M., Bravo, R. (1988) Transcriptional activation of c-jun during the G0/G1 transition in mouse fibroblasts. *Nature* 334:535-539.

Sadowski, H.B., Shuai, K., Darnell, J.E., Gilman, M.Z. (1993) A common nuclear signal transduction pathway activated by growth factor and cytokine receptor. *Science* 261:1739-1744.

Sakamaki, K., Miyajima, I., Kitamura, T., Miyajima, A. (1992) Critical cytoplasmic domains of the common  $\beta$  subunit of the human GM-CSF, IL-3 and IL-5 receptors for growth signal transduction and tyrosine phosphorylation. *EMBO J.* 11:3541-3549.

Salavert, A., Iynedjian, P.B. (1982) Regulation of phosphoenolpyruvate carboxykinase (GTP) synthesis in rat liver cells. *J. Biol. Chem.* 267:13404-13412.

Schmid, E., Schiller, D.L., Grund, C., Stadler, J., Franke, W.W. (1983) Tissue type-specific expression of intermediate filament proteins in a cultured epithelial cell line from bovine mammary gland. *J. Cell. Biol.* 96:37-50.

Shirota, M., Banville, D., Ali, S., Jolicoeur, C., Boutin, J.M., Edery, M., Djiane, J., Kelly, P.A. (1990) Expression of two forms of prolactin receptor in rat ovary and liver. *Mol. Endocrinol.* 4:1136-1142.

Shiu, R.P.C., Elsholtz, H.P., Tanaka, T., Friesen, H.G., Gout, P.W., Beer, C.T., Noble, R.L. (1983) Receptor-mediated mitogenic action of prolactin in a rat lymphoma cell line. *Endocrinology* 113:159-165.

Shuai, K., Horvath, C.M., Huang, L.H., Qureshi, S.A., Cowburn, D., Darnell, J.E. Jr. (1994) Interferon activation of the transcription factor Stat91 involves dimerization through SH2-phosphotyrosyl peptide interactions. *Cell* 76:821-828.

Shuai, K., Stark, G.R., Kerr, I.M., Darnell, J.E. (1993) A single phosphotyrosine residue of Stat91 required for gene activation by Interferon- $\gamma$ . *Science* 261:1744-1746.

Sidis, Y., Horseman, N.D. (1994) Prolactin induces rapid p95/p70 tyrosine phosphorylation, and protein binding to GAS-like sites in the *anx* *Icp35* and *c-fos* genes. *Endocrinology* 134:1979-1985.

Silvennoinen, O., Schindler, C., Schlessinger, J., Levy, D.E. (1993) Ras-independent growth factor signaling by transcription factor tyrosine phosphorylation. *Science* 261:1736-1739.

Silvennoinen, O., Witthuhn, B.A., Quelle, F., Cleveland, J., Yi, T., Ihle, J.N. (1993) Structure of the murine Jak2 protein-tyrosine kinase and its role in interleukin 3 signal transduction. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90:8429-8433.

Southern, P.J., Berg, P. (1982) Transformation of mammalian cells to antibiotic resistance with a bacterial gene under control of the SV40 early region promoter. *J. Mol. Appl. Genet.* 1:327-341.

Standke, G.J., Meier, V.S., Groner, B. (1994) Mammary gland factor activated by prolactin on mammary epithelial cells and acute-phase response factor activated by interleukin-6 in liver cells share DNA binding and transactivation potential. *Mol. Endocrinol.* 8:469-477.

Taga, T., Hibi, M., Hirata, Y., Yamasaki, K., Yasukawa, K., Matsuda, T., Hirano, T., Kishimoto, T. (1989) A human high affinity interleukin-5 receptor (IL5R) is composed of an IL5-specific alpha chain and a beta chain shared with the receptor for GM-CSF. *Cell* 58:573-581.

Takaki, S., Tominaga, A., Hitoshi, Y., Mita, S., Sonada, E., Yamaguchi, N., Takatsu, K. (1990) Molecular cloning and expression of the murine interleukin-5 receptor. *EMBO J.* 9:4367-4374.

Taniguchi, T. (1995) Cytokine signaling through nonreceptor protein tyrosine kinases. *Science* 268:251-255.

Tavernier, J., Devos, R., Cornelis, S., Tuypens, T., Van der Heyden, J., Fiers, W., Plaetinck, G. (1991) A human high affinity interleukin-5 receptor (IL5R) is composed of an IL5-specific alpha chain and a beta chain shared with the receptor for GM-CSF. *Cell* 66:1175-1184.

Thoreau, E., Petridou, B., Kelly, P.A., Djiane, J., Mornon, J.P. (1991) Structural symmetry of the extracellular domain of the cytokine/growth hormone/prolactin receptor family and interferon receptors revealed by hydrophobic cluster analysis. *FEBS Lett.* 282:26-31.

Torigoe, T., O'Connor, R., Fagard, R., Fischer, S., Santoli, D., Reed, J.C. (1992a) Regulation of SRC-family protein tyrosine kinases by interleukins, IL-2, and IL-3. *Leukemia* 6:94S-97S.

Torigoe, T., Saragovi, H.U., Reed, J.C. (1992) Interleukin 2 regulates the activity of the lyn protein-tyrosine kinase in a B-cell line. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 89:2674-2678.

Truitt, K.E., Mills, G.B., Turck, C.W., Imboden, J.B. (1994) SH2-Dependent association of phosphatidylinositol 3'-kinase 85-kDa regulatory subunit with the interleukin-2 receptor  $\beta$  chain. *J. Biol. Chem.* 269:5937-5943.

Uddin, S., Yenush, L., Sun, X.J., Sweet, M.E., White, M.F., Platanias, L.C. (1995) Interferon- $\alpha$  engages the insulin receptor substrate-1 to associate with the phosphatidylinositol 3'-kinase. *J. Biol. Chem.* 270:15938-15941.

VanderKuur, J., Allevato, G., Billestrup, N., Norstedt, G., Carter-Su, C. (1995) Growth hormone-promoted tyrosyl phosphorylation of SHC proteins and SHC association with Grb2. *J. Biol. Chem.* 270:7587-7593.

Villalba, M., Zabala, M.T., Martínez-Serrano, A., Colina, R., Satrústegui, J., García-Ruiz, J.P. (1991) Prolactin increases cytosolic free calcium concentration in hepatocytes of lactating rats. *Endocrinology* 129:2857-2861.

Wang, L.M., Keegan, A.D., Paul, W.E., Heidaran, M.A., Gutkind, J.S., Pierce, J.H. (1992) IL-4 activates a distinct signal transduction cascade from IL-3 in factor-dependent myeloid cells. *EMBO J.* 11:4899-4908.

Wang, L.M., Myers, M.G., Sun, X.J., Aaronson, S.A., White, M.F., Pierce, J.H. (1993) IRS-1: essential for insulin and IL-4-stimulated mitogenesis in hematopoietic cells. *Science* 261:1591-1594.

Waters, M.J., Daniel, N., Bignon, Ch., Djiane, J. (1995) The rabbit mammary gland prolactin receptor is phosphorylated in response to prolactin in vivo and in vitro. *J. Biol. Chem.* 270:5136-5143.

Welham, M.J., Durnio, V., Leslie, K.B., Bowtell, D., Schrader, J.W. (1994) Multiple hemopoietins, with the exception of interleukin-4, induce modification of Shc and mSos1, but not their translocation. *J. Biol. Chem.* 269:21165-21176.

White, M.F. (1994) The IRS-1 signaling system. *Curr. Opin. Gen. Dev.* 4:47-54.

Yamasaki, K., Taga, T., Hirata, Y., Yawata, H., Kawanishi, Y., Seed, B., Taniguchi, T., Hirano, T., Kishimoto, T. (1988) Cloning and expression of the human interleukin-6 (BSF-2/IFN beta 2) receptor. *Science* 241:825-828.

Ymer, S.I., Kelly, P.A., Herington, A.C., Djiane, J. (1987) Immunological relationship and binding capacity of prolactin receptors in cytosolic and membrane fractions of rabbit mammary gland. *Mol. Cell. Endocrinol.* 53:67-73.

Yoo-Warren, H., Cimbala, M.A., Kenneth, F., Monahan, J.E., Leiss, J.P., Hanson, R.W. (1981) Identification of a clone to phosphoenolpyruvate carboxykinase (GTP) from rat liver cytosol. *J. Biol. Chem.* 256:10224-10227.

Yu-Lee, L.Y. (1990) Prolactin stimulates transcription of growth-related genes in Nb2 T lymphoma cells. *Mol. Cell. Endocrinol.* 68:21-28.

Yu-Lee, L.Y., Hrachovy, J.A., Stevens, A.M., Schwarz, L.A. (1990) Interferon-regulatory factor 1 is an immediate-early gene under transcriptional regulation by prolactin in Nb2 T cells. *Mol. Cell. Biol.* 10:3087-3094.

Zabala, M.T., García-Ruiz, J.P. (1989) Regulation of expression of the messenger ribonucleic acid encoding the cytosolic form of Phosphoenolpyruvate carboxykinase in liver and small intestine of lactating rats. *Endocrinology* 125:2587-2593.

Zhang, R., Buczko, E., Tsai-Morris, C-H., Hu, Z-Z, Dufau, M. (1990) Isolation and characterization of two novel rat ovarian lactogen receptor cDNA species. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 168:415-422.

Zhong, Z., Wen, Z., Darnell, J.E. Jr (1994) Stat3: a STAT family member activated by tyrosine phosphorylation in response to epidermal growth factor and interleukin-6. *Science.* 264:95-98.